

ANA PAULA RESSETTI ABUD

**ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE COMPLEXOS ALTAMENTE
DILUÍDOS SOBRE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA MURINA E LINHAGEM
LEUCÊMICA HUMANA**

CURITIBA

2010

ANA PAULA RESSETTI ABUD

**ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE COMPLEXOS ALTAMENTE
DILUÍDOS SOBRE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA MURINA E LINHAGEM
LEUCÊMICA HUMANA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito à obtenção
do título de Doutor em Biologia Celular e
Molecular**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA

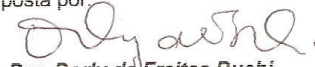
2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

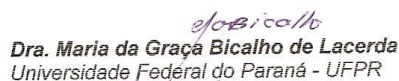
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



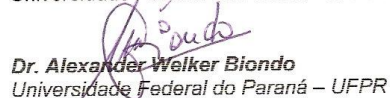
Dra. Dorly de Freitas Buchi
Orientadora da Universidade Federal do Paraná - UFPR



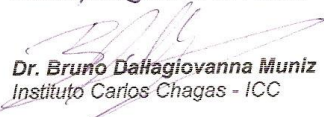
Dra. Carla Holandino Quaresma
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Dra. Maria da Graça Bicalho de Lacerda
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Dr. Alexander Welker Biondo
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz
Instituto Carlos Chagas - ICC

e tendo como suplentes,

Dra. Mariana Piemonte Moretão
Universidade Positivo - UP

Dr. Silvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR

após arguir o(a) doutorando(a) **Ana Paula Ressetti Abud**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: **"Atividade de complexos altamente diluídos sobre células de medula óssea de camundongos"**, é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.


Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

Curitiba, 31 de agosto de 2014

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19033 - FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA - PARANÁ



AGRADECIMENTOS

A Deus, “energia suprema do universo” pela oportunidade de viver e aprender cada vez mais...

Aos camundongos, pois sem eles não seria possível a realização desse trabalho!

A Dorly, pela orientação constante, tanto científica quanto pessoal. Agradeço pela amizade, apoio e por sempre acreditar em mim... Tenho certeza de que você é uma das pessoas que trago há muito tempo e que levarei para sempre...

Aos meus pais, Angela e Brazílio, por todo amor, carinho, dedicação e apoio incondicionais. Sou privilegiada por ter vocês em minha vida, pessoas mais que especiais e companheiros de caminhada, que me ensinam e ajudam a crescer e evoluir! Amo vocês!

Ao meu irmão Neto, pela amizade, carinho e por existir perto de mim!

Ao meu noivo Rodrigo, pelo amor, paciência, auxílio, carinho, apoio, enfim, palavras são pouco para mostrar sua importância na minha vida! Agradeço por ser meu companheiro de caminhada e por me ajudar a perceber a importância das coisas simples da vida... Amo você! Obrigada por me fazer mais feliz!

Aos meus amigos! Não citarei os nomes, mas tenho certeza que todos sabem da importância que têm em minha vida! Aos antigos e aos recentes, aos que estão sempre ao meu lado e aos que encontro raramente, aos que há anos não vejo, mas que sempre estão presentes, graças à internet... Todos são especiais e têm qualidades maravilhosas! Agradeço por fazerem minha vida mais feliz e divertida, pelo apoio e incentivo constantes. Todos sabem que amigos nós escolhemos e sei que fiz as melhores escolhas possíveis!

Aos amigos e colegas do laboratório de todos esses anos! Agradeço por me auxiliarem durante os experimentos e também pelos momentos de descontração e brincadeiras. Pessoas especiais, que pretendo levar por toda a vida! Agradeço especialmente à Beatriz, por iniciar esse trabalho comigo, enfrentando as dificuldades iniciais e pelos momentos de diversão, à Luciana, pela colaboração nos experimentos de verificação da atividade enzimática e presença constante, à Edielly, pelo auxílio, disposição e companheirismo, ao

Fernando, por ceder a medula óssea dos camundongos C57BL/6 portadores de melanoma B16F10 e também pela disponibilidade, à Carolina pela disponibilidade e “consultorias de inglês” e à Simone, por ser minha companheira de doutorado, pela presença, auxílio, enfim, por tudo que passamos juntas durante esses anos! A todos agradeço pela amizade que construímos durante os anos de convivência.

A Elisabeth, pela disponibilidade e auxílio durante a coleta celular.

A professora Almeriane Weffort pela atenção e disponibilização de equipamentos.

Ao professor Sílvio Sanches e aos integrantes do laboratório de Matriz Extracelular pela atenção e disponibilização de equipamentos.

A professora Lia Nakao pela atenção e auxílio durante a discussão dos resultados das espécies reativas. Agradeço também à Beatriz pelo auxílio durante o experimento de verificação da presença de nitroproteínas.

Ao professor Luiz Cláudio Fernandes e ao Marcelo pelo auxílio durante o experimento de verificação da ocorrência de peroxidação lipídica.

Ao farmacêutico Narciso Da Lozzo Neto pela disponibilização dos complexos altamente diluídos.

Aos profissionais do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR especialmente Iselen, Cândido, Ana e Luís, pela atenção e auxílio constantes.

Ao CNPq, ao SETI Paraná e à Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

As secretárias Mirian, do Departamento de Biologia Celular, e Marlene, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio nas questões administrativas.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, em especial ao Franco Cardoso, pelo fornecimento do fator de diferenciação M-CSF.

Aos integrantes do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela ajuda na preparação e visualização do material.

Aos professores Carla Holandino Quaresma, Maria da Graça Bicalho de Lacerda, Alexander Welker Biondo e Bruno Dallagiovanna Muniz pela participação na banca avaliadora e pelas sugestões e comentários valiosos. Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, quer seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

RESUMO

A medula óssea apresenta uma vascularização especial e um microambiente altamente protegido, o que proporciona um habitat ideal para a manutenção das células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e sua diferenciação. Além das HSCs, outro grupo celular muito importante presente nesse microambiente é o das células-tronco mesenquimais (MSCs), as quais compõem, juntamente com outros grupos celulares e moléculas, o estroma medular. Nosso laboratório estuda complexos altamente diluídos há mais de 10 anos e, no presente trabalho, foram utilizados os seguintes compostos: *Chelidonium majus* e associações (M1); *Cinnamon* ou *Cinnamomum verum* e associações (M2); *Curcuma longa* e associações (M4); *Gelsemium sempervirens* e associações (M5); *Aconitum napellus* e associações (M6) e *Calcarea carbonica* e associações (M8), todos preparados segundo técnicas homeopáticas. Esse trabalho tem como objetivo o aprofundamento dos mecanismos de ação de diferentes complexos de medicamentos altamente diluídos e, para isso, realizamos experimentos utilizando células de medula óssea de camundongos saudáveis, portadores de tumores de melanoma e células humanas da linhagem eritroblástica leucêmica K-562, sendo que os tratamentos foram administrados *in vitro* e *in vivo*. Após as análises verificamos que os complexos agiram sobre as células medulares de camundongos, mas não alteraram as células leucêmicas, nos parâmetros analisados. As alterações observadas demonstraram que os complexos modificaram o perfil das populações medulares indicando a ocorrência de proliferação e/ou diferenciação, recrutamento, *homing* (retorno para o microambiente medular) e manutenção das células, contribuindo para a manutenção de uma situação de equilíbrio.

palavras-chave: medula óssea; complexos altamente diluídos; imunofenotipagem.

ABSTRACT

The bone marrow has a specialized vascular anatomy and the bone shield environment provides an ideal milieu for hematopoietic stem-cell (HSCs) maintenance and development into mature cells. This microenvironment comprises macrophages, endothelial cells, fibroblasts, adipocytes, osteogenic cells, mesenchymal stem cells (MSCs), cytokines, and extracellular matrix. The primary bone marrow stroma function is to provide structural support upon which hematopoiesis occurs. Our lab has been working with highly diluted complexes for over 10 years and in this work we have used the following products: *Chelidonium majus* and associations (M1), *Cinnamon* or *Cinnamomum verum* and associations (M2), *Curcuma longa* and associations (M4), *Gelsemium sempervirens* and associations (M5), *Aconitum napellus* and associations (M6), and *Calcareo carbonica* and associations (M8). We have evaluated the *in vitro* and *in vivo* effects of treatment in mice bone marrow cells and human leukemic lineage K-562 by several assays. After data analysis we observed that treatment alters bone marrow populations profile but does not modify any of tested parameters from leukemic lineage cells. The results indicate that treatment induces cell proliferation and/or differentiation, recruitment, homing, maintenance, and contribution to homeostasis.

key words: bone marrow cells; highly diluted complexes; immunophenotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO MICROAMBIENTE MEDULAR	16
FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS A PARTIR DE UM PRECURSOR COMUM	23
FIGURA 3 - RESUMO DA ERITROPOIESE	28
GRÁFICO 1 - LOCALIZAÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES NA POPULAÇÃO TOTAL DA MEDULA ÓSSEA	29
FIGURA 4 - CÂMARA INALANTE	40
FIGURA 5 - PLACA DE CO-CULTURA E DETALHAMENTO DO POÇO CONTENDO O <i>TRANSWELL</i>	47
FIGURA 6 - CONTROLE DA REAÇÃO ENZIMÁTICA	50
FIGURA 7 - AcPase <i>IN VITRO</i>	52
FIGURA 8 - TRAP <i>IN VITRO</i>	53
FIGURA 9 - AcPase e TRAP <i>IN VIVO</i>	54
GRÁFICO 2 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO	55-56
GRÁFICO 3 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	56-57
GRÁFICO 4 - GRÁFICO DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	57
FIGURA 10 - PRESENÇA DE NITROTIROSINAS NAS PROTEÍNAS CELULARES	58
GRÁFICO 5 - LIBERAÇÃO DE TNF α APÓS 72 E 96 HORAS DE CULTURA	59
GRÁFICO 6 - PRESENÇA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	62
FIGURA 11 - MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA	66
FIGURA 12 - MEV DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS APÓS CO-CULTURA COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	68
FIGURA 13 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO COM M6	79
FIGURA 14 - IMAGENS DE PULMÃO APÓS A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	88
FIGURA 15 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM M1 E M8	90
FIGURA 16 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> , ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER, COM M1, M2, M4, M5, M6 E M8	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DA AcPase E TRAP	51
TABELA 2 - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO SOBRENADANTE DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	60
TABELA 3a - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	60
TABELA 3b - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	61
TABELA 4 - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> POR VIA INALATÓRIA	63
TABELA 5 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CONEXINA 43 NAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	64
TABELA 6 - ANÁLISE DO MARCADOR CD11b APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	65
TABELA 7 - EFEITO DOS COMPLEXOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE DA LINHAGEM K-562 <i>IN VITRO</i>	69
TABELA 8 - EFEITO DOS COMPLEXOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM K-562 <i>IN VITRO</i>	69
TABELA 9 - RESUMO DOS RESULTADOS DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO PELAS CÉLULAS MEDULARES, APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - célula apresentadora de antígenos;
AcPase - fosfatase ácida total;
ANOVA - análise de variância;
ATCC - *American Type Culture Collection*;
BAFF - fator ativador de células B;
BFU - unidade formadora de blastos;
B16F10 - modelo celular de melanoma murino;
CD - *cluster of differentiation*;
CD3 – co-receptor de linfócitos T;
CD3 ϵ - subunidade do complexo TCR-CD3
CD34 - receptor de célula tronco hematopoiética humana;
CD4 - co-receptor de células T auxiliar;
CD45R (B220) - receptor de linfócitos B;
CD11b (Mac-1) - integrina α M de membrana presente em monócitos/macrófagos;
CD11c - integrina α X de membrana presente em células dendríticas;
CD14 - receptor de monócitos;
CFU - unidade formadora de colônia;
c-Kit – receptor de célula tronco hematopoiética de camundongo;
Cl⁻ - ânion cloreto;
CLP - progenitor linfóide;
CMP - progenitor mielóide;
CSF-1R/CD115 - receptor do M-CSF;
CXCR4 - receptor do SDF-1;
C57BL/6 - linhagem de camundongos isogênicos,
DAPI - 4,6 - *diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride*;
DC - *dendritic cell*;
DMEM – *dulbecco's Modified Eagle Medium*;
D.O. - densidade óptica;
EB - eritroblasto basófilo;
EPC - eritroblasto policromatófilo;
EOC - eritroblasto ortocromático;
EPO - eritropoetina;
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial;
ERK 1 e 2 – proteína envolvida no controle da expressão gênica;
Fe⁺² - íon ferroso;
Fe⁺³ - íon férrico;
FITC - fluoresceína;
FSC - *forward scatter*;
GM-CSF - fator estimulador de colônia degranulócitos/monócitos/macrófagos);
GMP - progenitor de granulócito-macrófago;
GPA - glicoforina A;
HBSS - *hank's Buffer Salt Solution*;
HCM - *homeopathic complex medication*;
4-HNE - 4-hydroxynonenal;
HOCl – ácido hipocloroso;
HRPO – *horseradish peroxidase*;

HS - solução hidroalcoólica;
 HSC - célula tronco hematopoiética;
 HSPC - célula tronco/progenitora hematopoiética;
 H_2O_2 - peróxido de hidrogênio;
 IgG - imunoglobulina G;
 IL - interleucina;
 IFN_γ - interferon γ ;
 iNOS – óxido nítrico sintase induzível;
 JAK2 - proteína tirosino-quinase;
 K-562 - linhagem eritroblástica leucêmica;
 LIF - fator inibidor de leucemia;
 Ly6G (Gr-1) - marcador da série granulocítica;
 LPS - lipopolissacarídeo;
 L929 - fibroblastos tumorigênicos de camundongos;
 M-CSF - fator estimulador de colônias de monócitos/macrófagos;
 MEV - microscopia eletrônica de varredura;
 MHC - complexo principal de histocompatibilidade;
 MEK 1 e 2 – proteína quinase que fosforila resíduos de tirosina e treonina de ERK 1 e 2;
 MEP - progenitor eritróide;
 MMP-9 - metaloproteinase-9;
 MPO – enzima mieloperoxidase;
 MSC – célula tronco mesenquimal;
 NADPH oxidase - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*;
 NaNO_2 - Nitrito de sódio;
 $\text{NF}\kappa\text{B}$ – fator de transcrição;
 NK - células *natural killer*
 NO - óxido nítrico;
 NO_2^- - nitrito;
 nNOS - óxido nítrico sintase neuronal;
 NOX2 – NADPH oxidase presente em fagócitos;
 O_2^- - ânion superóxido;
 OH^- - radical hidroxila;
 ONOO^- - peroxinitrito;
 PBS - *phosphate Buffer Solution*;
 PE - ficoeritrina;
 PE - proeritroblasto;
 PMA - *phorbol myristate acetate*;
 PO_4^{3-} - grupo fosfato;
 p21 - proteína reguladora do ciclo celular;
 p53 - fator de transcrição nuclear;
 RAF-1- proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase;
 RET - oncogene;
 ROS - espécies reativas de oxigênio;
 RNS - espécies reativas de nitrogênio;
 Rt - reticulócito;
 SCF - fator de célula tronco;
 SDF-1/CXCL12 - *stromal cell-derived factor-1*;
 SFB - soro fetal bovino;
 SCA-1 - receptor de célula tronco hematopoiética de camundongo;

SOD - enzima superóxido dismutase;
SSC - *side scatter*;
TCR - receptor de célula T
TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná;
TER-119 (Ly-76) - marcador da série eritrocítica;
TFR - receptor de transferina;
TNF α - fator α de necrose tumoral;
TPO - trombopoetina;
TPP - trifenilfosfina;
TRAP - fosfatase ácida resistente ao tartarato;
VLA-4 - *very late antigen-4*;
VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule-1*;

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 MEDULA ÓSSEA	16
2.1.1 ESTROMA MEDULAR	17
2.1.2 HEMATOPOIESE E CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (HSCs)	18
2.1.2.1 FATORES ESSENCIAIS AO PROCESSO HEMATOPOIÉTICO	20
2.1.2.1.1 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS (M-CSF)	21
2.1.2.2 LINHAGENS HEMATOPOIÉTICAS E CÉLULAS DIFERENCIADAS	22
2.2 MOLÉCULAS INDICADORAS DE ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	29
2.3 HOMEOPATIA	32
2.3.1 COMPLEXOS ALTAMENTE DILUÍDOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 CÉLULAS	35
3.1.1 CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS	35
3.1.1.2 COLETA CELULAR	35
3.1.2 LINHAGEM CELULAR LEUCÊMICA - K-562	36
3.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS	36
3.3 CULTIVO CELULAR (CULTURA DE CURTA DURAÇÃO)	37
3.4 COMPOSTOS UTILIZADOS	37
3.5 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS - M-CSF	38
3.6 TRATAMENTOS UTILIZADOS	38
3.6.1 TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	38
3.6.2 TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	38
3.6.2.1 TRATAMENTO ATRAVÉS DE INJEÇÃO SUBCUTÂNEA	38
3.6.2.2 TRATAMENTO ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	39
3.6.2.3 TRATAMENTO ATRAVÉS DE INALAÇÃO	39
3.7 EXPERIMENTOS REALIZADOS	41
3.7.1 CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS	41
3.7.1.1 CITOQUÍMICA PARA FOSFATASE ÁCIDA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DE INJEÇÃO SUBCUTÂNEA	41
3.7.1.2 LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E NITROGÊNIO (RNS) <i>IN VITRO</i>	41
3.7.1.2.1 LIBERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O_2^-)	41
3.7.1.2.2 LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)	42
3.7.1.2.3 LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	42
3.7.1.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE NITROPROTEÍNAS <i>IN VITRO</i>	43

3.7.1.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS <i>IN VITRO</i>	44
3.7.1.5 IMUNOFENOTIPAGEM <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	44
3.7.1.6 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA REALIZADA PELAS CÉLULAS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	45
3.7.1.7 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> POR VIA INALATÓRIA	46
3.7.1.8 IMUNOMARCAÇÃO DE CONEXINA 43 <i>IN VITRO</i>	46
3.7.2 CÉLULAS MEDULARES E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EM CO-CULTURA	47
3.7.2.1 CITOMETRIA DE FLUXO	47
3.7.2.2 MICROSCOPIA CONFOCAL	48
3.7.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	48
3.7.3 CÉLULAS DA LINHAGEM ERITROBLÁSTICA LEUCÊMICA K-562	48
3.7.3.1 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE	48
3.7.3.2 VERIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	49

4. RESULTADOS **50**

4.1 CITOQUÍMICA PARA FOSFATASE ÁCIDA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	50
4.2 LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E NITROGÊNIO (RNS) PELAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	55
4.3 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS NITROSILADAS (NITROTIROSINAS) PRESENTES NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	58
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	58
4.5 IMUNOFENOTIPAGEM	59
4.5.1 RESULTADOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	59
4.5.2 RESULTADOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	60
4.6 VERIFICAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA REALIZADA PELAS CÉLULAS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER	62
4.7 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> POR VIA INALATÓRIA	63
4.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CONEXINA 43 APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	64
4.9 CÉLULAS MEDULARES E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS PERMANECEREM EM CO-CULTURA	64
4.9.1 MEDULA ÓSSEA	64
4.9.1.1 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD11b ⁺	64
4.9.1.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MARCADOR CD11b	66
4.9.2 MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS	67
4.9.2.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA	67
4.10 ANÁLISE DA LINHAGEM ERITROBLÁSTICA LEUCÊMICA HUMANA K-562 <i>IN VITRO</i>	69
4.10.1 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE	69
4.10.2 VERIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	69

5. DISCUSSÃO **71**

6. CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

Complexos altamente diluídos são estudados em nosso laboratório há mais de 10 anos. Resultados mostraram que esses complexos apresentam atividade sobre o sistema imunológico, através de uma ação imunomoduladora. A partir de então se realizaram inúmeros trabalhos sendo que, após se constatar que o tratamento *in vivo* alterou a taxa de linfócitos T CD4, B e *natural killer* (NK) em camundongos portadores de Sarcoma 180 (SATO *et al.*, 2005), decidimos analisar essa ação sobre a fonte dessas células, a medula óssea. Percebemos que o tratamento agiu nas células medulares de camundongos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, estimulando a aderência celular e contribuindo para a formação de ninhos, locais que permitem a proliferação e/ou diferenciação das células progenitoras (ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2007; CESAR *et al.*, 2009). Após a obtenção desses resultados consideramos importante dar continuidade ao estudo no microambiente medular e também em células patológicas isoladas como na linhagem leucêmica eritroblástica K-562. Consideramos fundamental o conhecimento dos mecanismos de ação desses complexos, visando futuras alternativas de terapia celular.

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente a atenção de cientistas e da indústria farmacêutica mundial está dirigida a novas formas de terapias imunomoduladoras para doenças crônicas como câncer, AIDS, hepatite C, leucemias, entre outras, que trazem um extremo desgaste físico e emocional, não só aos portadores, mas também a toda a família envolvida. Estas terapias imunomoduladoras são dirigidas às células específicas ou às citocinas que contribuem para a resposta imunológica e ficaram conhecidas como “modificadores da resposta biológica”. A eficácia de altas diluições de substâncias biologicamente ativas na modificação da resposta imunológica tem sido avaliada através de diferentes abordagens teóricas e experimentais. Por ser a medula óssea um órgão crítico para o desenvolvimento do organismo, fonte de todas as células sanguíneas e do sistema imunológico e uma vez que resultados prévios mostraram a presença de efeitos modulatórios dos compostos, na ativação e regulação da expressão de receptores e na liberação de citocinas em camundongos, pretendemos com o presente estudo aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação

de diferentes complexos de medicamentos altamente diluídos, bem como em outros modelos celulares da medula óssea.

Conforme já citado, resultados prévios nos mostraram que complexos altamente diluídos atuam sobre células de medula óssea de camundongos saudáveis. Essa afirmação nos permitiu a formulação de algumas hipóteses como, se essa atuação resultaria em ativação celular ou se esses complexos atuariam em outros parâmetros celulares, além dos já analisados. Surgiram então outras questões como, eventual atuação dos complexos sobre animais portadores de patologias e também sobre células patológicas. Para provar essas hipóteses executamos os objetivos citados a seguir.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de complexos altamente diluídos sobre células de medula óssea de camundongos e da linhagem leucêmica eritroblástica humana K-562.

1.2.2 Objetivos específicos

a) Análises das células de medula óssea de camundongos através de:

- Citoquímica para fosfatase ácida;
- Liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS);
- Detecção da presença de proteínas nitrosiladas (nitrotirosinas);
- Quantificação de citocinas;
- Verificação da ocorrência de peroxidação lipídica;
- Imunofenotipagem das células medulares de camundongos suíços saudáveis e C57BL/6 portadores de melanoma;
- Quantificação da expressão de conexina 43;

b) Análises das células medulares e macrófagos peritoneais de camundongos após permanecerem em co-cultura, através de:

- Avaliação da expressão do marcador CD11b na população medular;
- Análise morfológica dos macrófagos peritoneais;

c) Análises das células pertencentes à linhagem leucêmica eritroblástica K-562 através de:

- Verificação da viabilidade, apoptose e proliferação celular;

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um tecido mole, ideal para a manutenção das células-tronco hematopoiéticas (HSCs), sendo a principal fonte dessas células. Apresenta uma anatomia vascular especializada e localiza-se internamente aos ossos, o que confere a esse órgão um ambiente altamente protegido e, em constante troca com o restante do organismo (PAPAYANNOPOULOU; SCADDEN, 2008). Além das HSCs, esse microambiente especial é constituído pelas células estromais, citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular (MÜLLER-SIEBURG; DERYUGINA, 1995; WHETTON; GRAHAM, 1999). Nesse ambiente especial as HSCs se proliferam, diferenciam e atingem o estágio de maturação adequado para então se dirigirem aos tecidos periféricos e exercem suas funções características (BRYDER *et al.*, 2006). Nesse microambiente, além das HSCs, existe outro grupo distinto de células-tronco multipotentes, as células-tronco mesenquimais (MSCs), as quais apresentam potencial para a regeneração de tecidos como, ossos, cartilagem, músculo, tecido adiposo, tendões, ligamentos, entre outros, caracterizando-se como uma fonte promissora para a terapia celular (GURKAN; AKKUS, 2008).

A seguir mostraremos uma figura esquemática do microambiente medular.

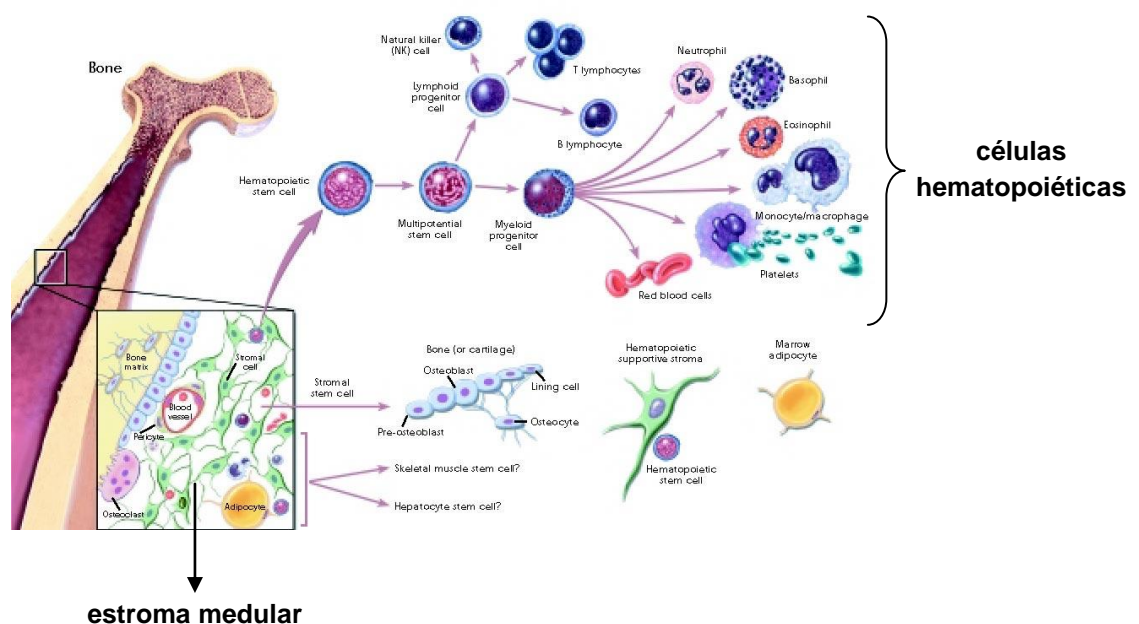


FIGURA 1: FIGURA ESQUEMÁTICA DO MICROAMBIENTE MEDULAR

Legenda: O estroma medular corresponde à população aderente e as células hematopoiéticas à população sobrenadante da medula óssea.

FONTE: www.stemcells.nih.gov

2.1.1 Estroma medular

O estroma medular contém uma população celular heterogenia, constituída de células reticulares, endoteliais, macrófagos, fibroblastos, adipócitos e células osteogênicas. Esse microambiente promove a interação célula-célula, a expressão e apresentação de citocinas e fatores de crescimento e a secreção de proteínas da matriz extracelular, fornecendo uma base favorável para a localização, auto-renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas e desenvolvimento da hematopoiese (MAJUMDAR *et al.*, 1998; TRAVLOS, 2006; WAGEY, 2008).

Para que esse microambiente se mantenha, a presença das células-tronco mesenquimais (MSCs) é essencial. São células aderentes, fibroblastóides e apresentam capacidade de se diferenciar nas células não-hematopoiéticas que compõem o estroma. Além disso, secretam citocinas como, IL-6, IL-11, fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), fator de células-tronco (SCF), IL-7, IL-8, IL-12, IL-14, IL-15, entre outras, além de auxiliar na sustentação das HSCs. Essas informações mostram a importância estrutural e funcional das MSCs para o estroma medular (MAJUMDAR *et al.*, 1998; TOCCI; FORTE, 2003; WAGEY, 2008). As MSCs são, originalmente, isoladas da medula óssea, sendo também encontradas no tecido adiposo, placenta, líquido amniótico e cordão umbilical. A capacidade de se diferenciar em células de origem mesodérmica, incluindo células ósseas, cartilaginosas e adiposas, é um dos critérios utilizados para caracterizar uma MSC, mas sabe-se que também são capazes de se diferenciar em células de origem endodérmica e ectodérmica (NAUTA; FIBBE, 2007).

2.1.2 Hematopoiese e células-tronco hematopoiéticas (HSCs)

A medula óssea representa o principal órgão hematopoiético, sendo essencial para a renovação dos elementos sanguíneos como, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, eritroblastos, eritrócitos, megacariócitos e plaquetas (TRAVLOS, 2006).

O processo hematopoiético corresponde a um organizado desenvolvimento hierárquico iniciado pelas HSCs. Essas células apresentam a capacidade de se comprometer, gradualmente e progressivamente, com as diferentes linhagens hematopoiéticas, o que resultará nas células sanguíneas diferenciadas (BRYDER *et al.*, 2006). A hematopoiese é mantida por um microambiente capaz de reconhecer e reter as HSCs e também prover fatores de crescimento e citocinas necessários para a proliferação, diferenciação e maturação dessas células. É um processo contínuo, que pode ser separado em estágios distintos. O primeiro estágio envolve células-tronco multipotentes na medula óssea, as quais apresentam, basicamente, duas funções: manutenção, através do processo de auto-renovação e capacidade de dar origem a todas as células e elementos hematopoiéticos (eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas). Dependendo da necessidade, o microambiente medular influencia essas células a se diferenciarem em células-tronco comprometidas com as séries mielóides e linfóides, constituindo o segundo estágio da hematopoiese. Essas células apresentam uma capacidade limitada de auto-renovação, mas apresentam grande capacidade de diferenciação em células maduras. Os progenitores mielóides são unidades formadoras de colônias com potencial para se diferenciar em granulócitos, eritrócitos, monócitos, células dendríticas e megacariócitos e os progenitores linfóides apresentam capacidade de originar linfócitos B, T e *natural killer* (NK) além de células dendríticas. O terceiro estágio é quando células-tronco comprometidas, influenciadas por vários fatores de crescimento, se diferenciam em células progenitoras linhagem-específicas. Neutrófilos e monócitos são exemplos de células originadas desse tipo celular (precursor comum) (WAGERS; WEISSMAN, 2004; BRYDER *et al.*, 2006; TRAVLOS, 2006).

Após a maturação, as células hematopoiéticas atravessam a parede dos vasos e se dirigem para a corrente sanguínea e tecidos periféricos. A produção, diferenciação e maturação dessas células são reguladas por fatores humorais. Alguns fatores agem nas células mais primitivas e apresentam uma ação geral enquanto outros agem nos progenitores mais comprometidos (TRAVLOS, 2006). As HSCs são raras (cerca de 0,1% do total das células medulares) (GOODELL *et al.*, 1996) e podem ser isoladas da medula óssea e sangue periférico. Caracterizam-se pela expressão de marcadores de superfície, por exemplo, as HSCs de camundongos apresentam como marcadores específicos o SCA-1 e o c-Kit enquanto as humanas são caracterizadas pela expressão do CD34. Outra característica é a ausência de marcadores linhagem-específicos como, por exemplo, B220, Gr-1, Mac-1 e TER-119 (KONDO *et al.*, 2003).

A localização, sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas na medula óssea são dependentes da interação com o microambiente medular. Essa interação é dinâmica e permite expansão e migração da medula óssea, dependendo da demanda fisiológica. O tráfico das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) entre a medula óssea e sangue periférico contribui para a manutenção da hematopoiese. A proliferação e diferenciação dessas células, no microambiente medular, ocorrem em locais especializados denominados nichos, os quais permitem uma comunicação adequada entre as células hematopoiéticas e seu microambiente (MÉNDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007). Essa comunicação é mediada via fatores solúveis e moléculas de adesão. Junções comunicantes, as quais são formadas por uma família de moléculas complexas de membrana, ocorrem nas células medulares e transferem mediadores solúveis entre as células adjacentes, participando assim da manutenção de um microambiente adequado para a hematopoiese (FOSS *et al.*, 2009). Após o desenvolvimento, as células são capazes de deixar o microambiente medular, mas, uma pequena porção de células indiferenciadas acaba migrando da medula óssea durante a vida do organismo. Para que as células migrem é necessária uma interação entre citocinas/quimiocinas, proteases e moléculas de adesão (PAPAYANNOPOULOU, 2004; PAPAYANNOPOULOU; SCADDEN, 2008).

2.1.2.1 Fatores essenciais ao processo hematopoiético

Uma complexa interação de citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e moléculas de adesão mantém as HSCs ancoradas ao estroma medular. Proteínas e moléculas de adesão como, selectinas e integrinas, então envolvidas na interação células progenitoras - estroma medular, sendo que a integrina VLA-4 se expressa nas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) e apresenta afinidade pela VCAM-1 da célula estromal. Outro exemplo é a ligação da E-selectina (células estromais) e E-selectina ligante (HSCs). Essas interações contribuem para a movimentação das células na medula e também para o processo de *homing* (retorno das células para o microambiente medular). A ativação de enzimas proteolíticas, como por exemplo, metaloproteinase-9 (MMP-9) resulta na degradação de proteínas de ancoragem, habilitando a movimentação e migração celular (MÉNDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007; KAPLAN *et al.*, 2007).

Citocinas controlam, rigidamente, a produção das células hematopoiéticas. Cada citocina apresenta múltiplas ações mediadas por receptores celulares, os quais apresentam domínios citoplasmáticos com regiões especializadas que são capazes de iniciar várias respostas como, sobrevivência, proliferação, diferenciação, comprometimento, maturação e ativação funcional. Esses fatores podem ser linhagem-específicos ou atuar na regulação de múltiplas linhagens ao mesmo tempo, podem regular apenas células-tronco ou células-tronco e células já comprometidas. A proliferação celular geralmente requer a ação de múltiplas citocinas (METCALF, 2008).

Essas moléculas apresentam fontes e funções variadas. A seguir descreveremos as citocinas e fatores de crescimento mais importantes para a hematopoiese.

Eritropoetina (EPO): produzida principalmente no rim e estimula a proliferação e diferenciação dos progenitores eritrocíticos;

GM-CSF, M-CSF e G-CSF: produzidos por uma variedade de células, incluindo células estromais, monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos e placenta e estão envolvidos nos processos de proliferação e/ou diferenciação celular;

IL-1: produzida pelos macrófagos e envolvida na maturação das células B;

IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6: produzidas pelas células T e envolvidas na estimulação das células B; IL-3, IL-5 e IL-6 também estão envolvidas na regulação dos granulócitos;

IL-11: produzida pelas células estromais e está envolvida na megacariopoiese;

SCF: produzido pelas células estromais. Liga-se ao receptor c-Kit e ativa uma cascata de reações críticas para proliferação, migração e diferenciação das HSCs;

Trombopoetina (TPO): produzida pelas células estromais e está envolvida na megacariopoiese;

IFN γ : produzido pelas células T e envolvido na ativação de células fagocíticas;

TNF α : produzido pelos macrófagos e estimula células progenitoras já comprometidas (ZHU; EMERSON, 2002; TRAVLOS, 2006; MÉNDEZ-FERRER; FRENETTE 2007; METCALF, 2008).

Três desses fatores, EPO, G-CSF e GM-CSF são utilizados rotineiramente em tratamentos clínicos, para a estimulação da produção celular (METCALF, 2008). O G-CSF está envolvido na mobilização celular e induz proliferação, ativação e degranulação de neutrófilos após liberação de serina-proteases, como elastase e G-catepsina, no microambiente medular. Essas enzimas são capazes de clivar VCAM-1, c-Kit, CXCL12 e CXCR4 (MÉNDEZ-FERRER e FRENETTE 2007). Já está estabelecido o papel do NF κ B como segundo mensageiro de citocinas hematopoiéticas como, IL-3, EPO, IL-6, SCF e GM-CSF (BUGARSKI *et al.*, 2007).

2.1.2.1.1 Fator estimulador de colônias de monócitos/macrófagos (M-CSF)

O M-CSF é o regulador primário da produção de fagócitos mononucleares *in vivo* e apresenta ação fundamental sobre a sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação da linhagem monocítica. Esses efeitos são mediados pelo CSF-1R (CD115), receptor que apresenta alta afinidade por esse fator. Esse receptor apresenta atividade tirosino-quinase e sua ativação desencadeia uma cascata de fosforilações e desfosforilações intracelulares que culminará nas atividades celulares citadas (SCHÖNLAU *et al.*, 2003; BARREDA *et al.* 2004). Está presente em monoblastos, promonócitos, monócitos, macrófagos diferenciados e osteoclastos e é utilizado para separar essas células da série granulocítica (GUILBERT *et al.* 1980). O M-CSF é encontrado em extratos de tecidos e também

no sobrenadante de culturas de células e órgãos, sendo produzido em grande quantidade pelas células estromais da medula óssea (BARREDA *et al.*, 2004).

A ação estimulatória do M-CSF resulta em aumento da produção de diversas citocinas como G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$ e IFNs. Está envolvido também na produção de prostaglandina E, reativos de oxigênio e nitrogênio (MOORE *et al.* 1980), indicativos de ativação celular.

O M-CSF apresenta ação terapêutica no tratamento de neoplasias e doenças infecciosas. A administração em pacientes com leucemia mieloide aguda, depois da quimioterapia, mostrou benefícios como, diminuição do período de neutropenia. Também mostrou eficácia no controle de infecções em pacientes que receberam transplante de medula óssea (MOTOYOSHI *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Linhagens hematopoiéticas e células diferenciadas

Existem, basicamente, três principais classificações de células sanguíneas, derivadas das células-tronco hematopoiéticas (HSCs), linhagem mieloide, eritróide-megacariocitóide e linfóide. Em todas as linhagens, um processo extensivo de proliferação ocorre durante a diferenciação celular (KATSURA, 2002). Para isso existem, basicamente, dois progenitores comuns, o progenitor mieloide (CMP), que dará origem aos progenitores eritróide (MEP) e granulócito-macrófago (GMP) e o progenitor linfóide (CLP). O MEP dará origem aos eritrócitos e megacariócitos/plaquetas e o GMP originará os granulócitos e macrófagos. Já o CLP poderá originar as células B, T e NK. As células dendríticas resultam tanto da diferenciação das CMPs quanto das CLPs. Além dos progenitores citados existem muitos outros intermediários. Pode ocorrer também a diferenciação direta a partir de um progenitor mais indiferenciado, por exemplo, megacariócitos e eritrócitos podem se originar de um progenitor multipotente, não passando por um CMP intermediário (KATSURA, 2002; BRYDER *et al.*, 2006). Progenitores são morfologicamente semelhantes e uma maneira de separar as células mais indiferenciadas das diferenciadas é a capacidade que as HSCs e progenitores multipotentes imediatos apresentam de expulsar corantes como hoechst 33342 e rodamina-123 (BERTONCELLO; WILLIAMS, 2004).

A seguir mostraremos, de maneira simplificada, a diferenciação das células hematopoiéticas a partir de um precursor comum.

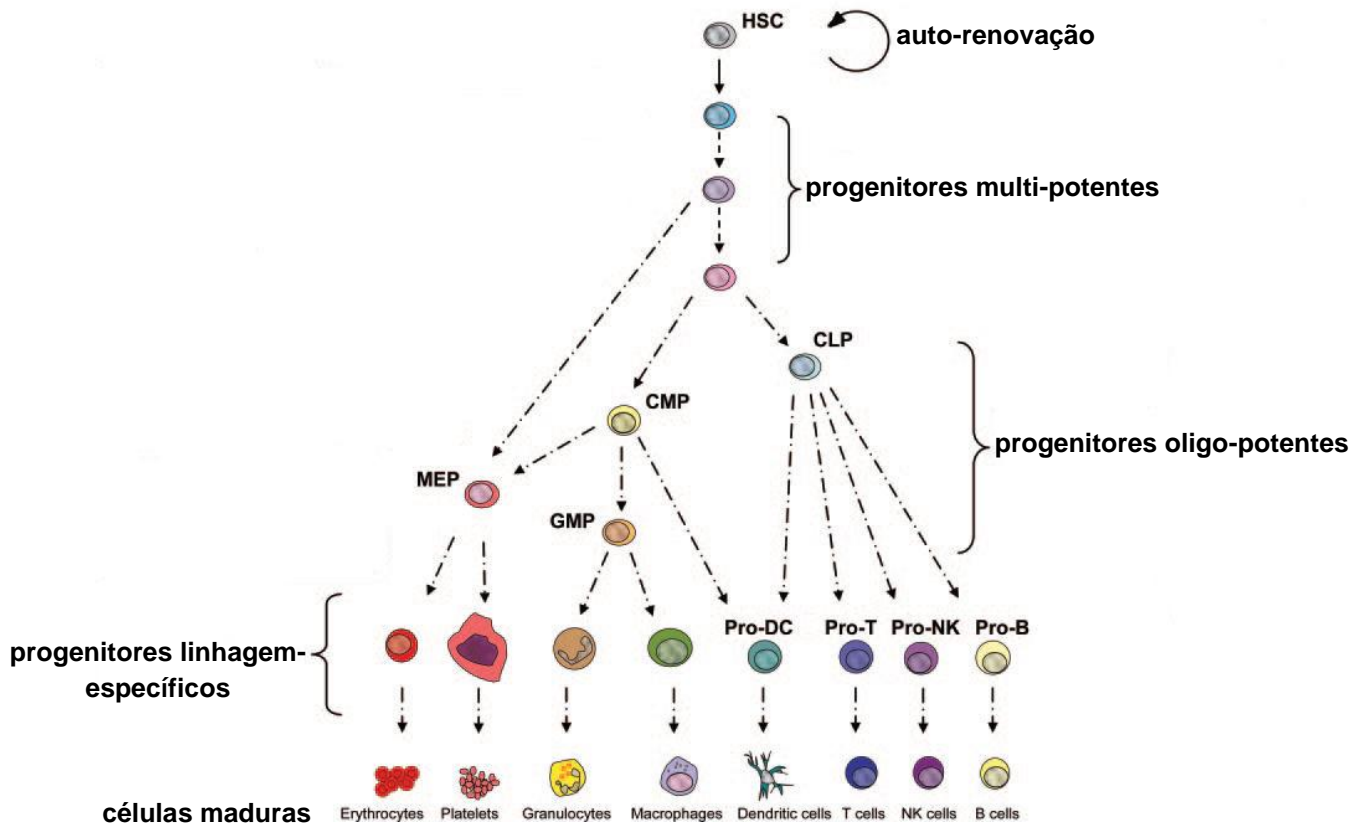


FIGURA 2: DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS A PARTIR DE UM PRECURSOR COMUM

Legenda: HSC - célula-tronco hematopoiética; CLP - progenitor linfóide; CMP - progenitor mielóide; MEP - progenitor megacariocitóide-eritróide; GMP - progenitor de monócitos-granulócitos.

FONTE: BRYDER *et al.*, 2006

Quanto maior o grau de diferenciação da célula hematopoiética mais características morfológicas específicas ela apresentará. A seguir faremos um breve apanhado dessas características, enfocando as utilizadas nesse trabalho, ou seja, presença de marcadores de superfície.

Monócitos/macrófagos: Os macrófagos são considerados os fagócitos profissionais mais eficientes, apresentando também uma importante função na imunidade adaptativa, cooperando com as células T e B como apresentadoras de antígenos e produtoras de citocinas (KATSURA, 2002). Essas células apresentam inúmeros marcadores de superfícies, sendo que o CD11b (Mac-1) é um dos mais

característicos. Está expresso em grande quantidade nos monócitos e também nos granulócitos maduros e sua expressão se inicia no estágio de promielócito. Também se expressa, mas em menor quantidade, em linfócitos T, B, NK e células dendríticas, não se apresentando em células formadoras de colônia. O CD11b é uma molécula de adesão (integrina de membrana - integrina α M ou ITGAM) estando envolvido nos processos de adesão e migração celular. A expressão desse receptor está intimamente relacionada com a capacidade de polimerização da actina, o principal componente do citoesqueleto envolvido na fagocitose. Está relacionado também aos processos de transdução de sinal intracelular (CIVIN; LOKEN, 1987; BROM *et al.* 1995; PEARCE *et al.*, 2004; *Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM - disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010).

Os monócitos e macrófagos murinos e humanos possuem receptores para manosil-fucosil, que se ligam aos açúcares presentes na parede celular de certos microorganismos e em células velhas ou desgastadas do organismo. Apresentam também receptores distintos para porção Fc os quais possuem funções que incluem desencadeamento da destruição extracelular e fagocitose de microorganismos (BROM *et al.* 1995).

Células dendríticas: São apresentadoras de antígenos profissionais, portanto regulam respostas imunológicas contra diversos agentes, incluindo agentes infecciosos e tumores (CITTERIO *et al.* 1999). Quando ativadas por algum estímulo, migram para os órgãos linfóides e regulam as respostas mediadas pelas células T (MA *et al.* 2004). Durante a migração, demonstram aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias além de tornarem-se competentes para ativar células B e T. As células imaturas apresentam-se aderidas e, quando maduras, diminuem sua capacidade de adesão, permanecendo em suspensão. As células imaturas apresentam maior capacidade de permanecerem retidas na medula óssea. Como apresentam capacidade de aderência, expressam altos níveis de moléculas de adesão como, a integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4). Essa molécula se expressa tanto em células imaturas quanto maduras e interage com a VCAM-1 e selectinas endoteliais, permitindo que a célula permaneça aderida ou efetue o rolamento na medula óssea e vasos sanguíneos. Essas células apresentam tropismo para a medula óssea e os sinais de recrutamento são similares à cascata de adesão que media o *homing* das

células progenitoras hematopoiéticas (HPCs) e células T, para esse microambiente (CITTERIO *et al.*, 1999; CAVANAGH *et al.*, 2005). Como apresentam esse tropismo são capazes de coletar antígenos nos tecidos periféricos e caminhar para a medula óssea para então estimular uma resposta das células T residentes. Essa migração ocorre constitutivamente (CAVANAGH *et al.*, 2005). As células dendríticas podem ser derivadas de progenitores mielóides e linfóides (KATSURA, 2002).

O CD11c é um dos principais marcadores das células dendríticas. É uma integrina de membrana, sendo conhecido também como integrina αX ou ITGAX, podendo se expressar, mas em menor quantidade, em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células B. Após ativação, desencadeia respostas celulares semelhantes ao CD11b, como, transdução de sinal intracelular, adesão, espraio, ativação celular e fagocitose (OMIM - disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010). A expressão dessa molécula está diretamente relacionada com a maturação celular (ESCOBAR *et al.*, 2005).

Linfócitos: São células derivadas de um precursor linfóide comum, se originam na medula óssea e se desenvolvem em órgãos como timo, fígado fetal, baço e medula óssea.

As células T podem ser subdivididas, basicamente, em auxiliares e citotóxicas. As T auxiliares estimulam outros tipos celulares em processos imunológicos, como, maturação de células B em plasmócitos, ativação de células T citotóxicas, macrófagos e neutrófilos, entre outras funções. Expressam em sua superfície a proteína CD4, sendo denominadas células TCD4. São ativadas quando apresentadas à antígenos, pelas moléculas de MHCII expressas nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Uma vez ativadas, secretam citocinas que regularão as respostas imunológicas. As T citotóxicas apresentam capacidade de eliminar células infectadas com partículas virais ou células tumorais. Expressam em sua superfície a glicoproteína CD8, sendo denominadas células TCD8. Reconhecem seus alvos após ligação com antígenos associados a moléculas MHCI dessas células (GUTCHER; BECHER, 2007; JIANG; CHESS, 2004). Linfócitos T expressam em sua superfície o receptor TCR, o qual consiste de duas cadeias polipeptídicas glicosiladas (α e β) unidas por ligações dissulfeto. O TCR α/β é por sua vez associado fisicamente a uma proteína denominada CD3, formando o complexo funcional TCR-CD3 na superfície dessas células. Nesse trabalho realizamos a

imunomarcação do polipeptídeo CD3 ϵ , o qual juntamente com CD3 γ , δ e ζ e o receptor TCR α/β forma o complexo TCR-CD3. Esse complexo apresenta papel importante no reconhecimento do antígeno o que resultará no desencadeamento de vias de transdução de sinais intracelulares. A porção épsilon desencadeia funções essenciais para o desenvolvimento das células T como, ativação e proliferação celular, ativação de proteína-G, regulação da apoptose, regulação da sinalização mediada por Ca⁺², produção de IL-2, fosforilação de proteínas, entre outras (OMIM - disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010).

As células B são linfócitos que desempenham papel importante nas respostas imunológicas humorais, ao contrário das células T que mediam respostas celulares. São produzidas na medula óssea e migram para o baço. Expressam, em sua superfície, imunoglobulinas que reconhecem epítopos antigênicos. Após essa interação ocorre uma seqüência de ativação das células B, as quais passam por inúmeras modificações morfológicas sendo que o estágio final são os plasmócitos, células produtoras de anticorpos. Nessa seqüência de modificações encontramos células B maiores que são precursores iniciais e apresentam, aproximadamente, 10-13 μ m, as quais após a divisão darão origem a células menores, com aproximadamente 9 μ m (células pré- B). A seqüência de proliferação e maturação das células B é regulada por fatores solúveis secretados pelas células estromais e, as modificações observadas incluem, além de alterações no tamanho, expressão de moléculas de superfície. Dentre essas moléculas podemos citar o CD45R (B220), o qual é uma proteína tirosino-fosfatase presente em grande quantidade nesse tipo celular. Essa molécula é mais utilizada para detectar células B de camundongos sendo que o CD19 é mais utilizado para células humanas (ROLINK *et al.*, 1996).

Durante a diferenciação, o CD45R é encontrado desde o estágio intermediário pró-B até nas células B maduras (TUDOR *et al.*, 2000; LEBIEN; TEDDER, 2008). Depois de estimulada, essa molécula de superfície contribui para o desempenho de inúmeras atividades celulares como, ativação, desenvolvimento, proliferação, diferenciação e apoptose (OMIM - disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010). As células B apresentam capacidade de retornar a medula óssea (*homing*) e lá terminar sua diferenciação até o estágio de plasmócito (PARAMITHIOTIS; COOPER, 1997).

Granulócitos: São produzidos na medula óssea e constituem a maior população de células brancas no sangue periférico. Durante o processo de diferenciação, essas

células passam por muitos estágios intermediários até a formação do granulócito maduro. Apresentam progenitor comum aos monócitos/macrófagos, sendo que os precursores podem ser diferenciados através da morfologia nuclear. Os dois tipos celulares apresentam núcleo em anel sendo que o precursor de granulócito apresenta o centro do anel mais largo e no precursor monocítico esse centro é estreito (BIERMANN *et al.*, 1999). A proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas são reguladas por citocinas, sendo que três estão diretamente envolvidas na regulação de granulócitos: IL-3, GM-CSF e G-CSF. G-CSF é o principal regulador da linhagem granulocítica, mas, na ausência dessa citocina, o estroma medular mantém a granulopoiese (IGUCHI *et al.*, 1997). São células caracterizadas pela presença de grânulos no seu citoplasma e também pela variedade de forma do núcleo (geralmente trilobulado), sendo também denominados de leucócitos polimorfonucleares. São subdivididos, basicamente, em três subgrupos, neutrófilos (o mais abundante), eosinófilos e basófilos.

Os neutrófilos apresentam papel crucial na imunidade inata. Essas células se encaminham até o foco inflamatório e eliminam bactérias invasoras, fungos e protozoários, através da fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de substâncias antimicrobianas e citotóxicas presentes nos seus grânulos, as quais se unem ao fagossomo ou são secretadas pelas células (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Espécies reativas de oxigênio, resultado do *burst* respiratório, também se interiorizam ao fagossomo (LEE *et al.*, 2003). Eosinófilos e basófilos se apresentam em quantidades bem reduzidas e estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata (alérgica). Granulócitos de camundongos apresentam como marcador característico o Ly6G (Gr-1) a qual é uma molécula transmembrana, envolvida na proliferação celular. A expressão desse marcador está diretamente relacionada com a diferenciação e maturação dos granulócitos, quanto maior o grau de maturação maior a expressão desse marcador. Também está presente na linhagem de monócitos/macrófagos e, quanto maior o grau de maturação dessas células, menor a expressão desse marcador. O marcador CD11b também se expressa em grande quantidade nos granulócitos. Portanto, uma maneira de distinguir esses dois tipos celulares é analisar o tamanho e complexidade interna através da técnica de citometria de fluxo (OMIM - disponível

em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010; CIVIN; LOKEN, 1987; LAGASSE; WEISSMAN, 1996).

Eritrócitos: São as células sanguíneas mais abundantes e sua função é transportar o oxigênio através dos vasos sanguíneos (KATSURA, 2002). As células diferenciadas são caracterizadas pela perda do núcleo e forma bicôncava. A eritropoiese ocorre na medula óssea, sendo que, o estroma medular e a matriz extracelular desempenham papel essencial nesse desenvolvimento (TSAI *et al.*, 1986). Essas células deixam esse microambiente no estágio de reticulócito e a principal citocina envolvida na eritropoiese é a eritropoetina (EPO) (ZHANG *et al.*, 2001). A seguir mostraremos um resumo da diferenciação da série eritrocítica.

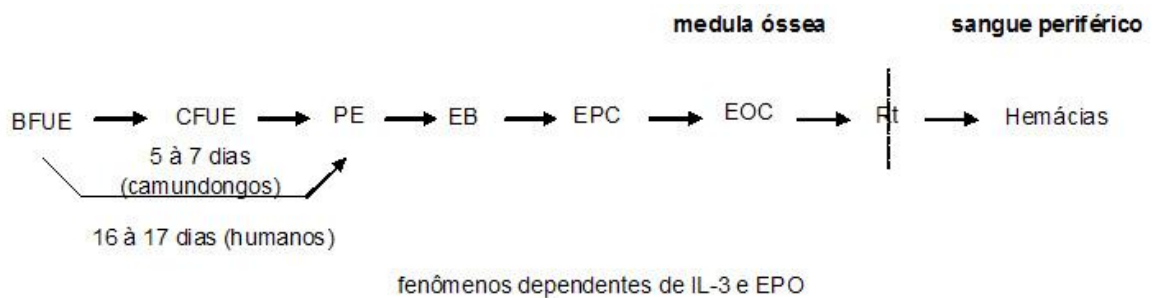


FIGURA 3: RESUMO DA ERITROPOIESE

Legenda: BFU-E - unidades formadoras de blastos; CFU-E - unidades formadoras de colônias; PE - proeritroblasto; EB - eritroblasto basófilo; EPC - eritroblasto policromatófilo; EOC - eritroblasto ortocromático; Rt - reticulócito.

FONTE: ABUD, 2005

As moléculas características dessa população correspondem ao receptor da transferina (TFR), glicoforina A (GPA) além da molécula de superfície TER-119 (Ly-76) (CIVIN; LOKEN, 1987). Esse marcador é uma glicoproteína de membrana, presente desde o estágio de proeritroblasto até o eritrócito maduro, não se apresentando nas unidades formadoras de blastos (BFU-E) e colônias (CFU-E) (KINA *et al.*, 2000). Em camundongos adultos, as células TER-119⁺ não expressam CD11b, Ly6G e CD45R em sua superfície (KINA *et al.*, 2000; OMIM - disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Acesso em: 07/06/2010).

A seguir mostraremos um gráfico obtido em citômetro de fluxo mostrando as diferenças, no que se diz respeito a tamanho e complexidade interna, em uma população celular total recém retirada da medula óssea.

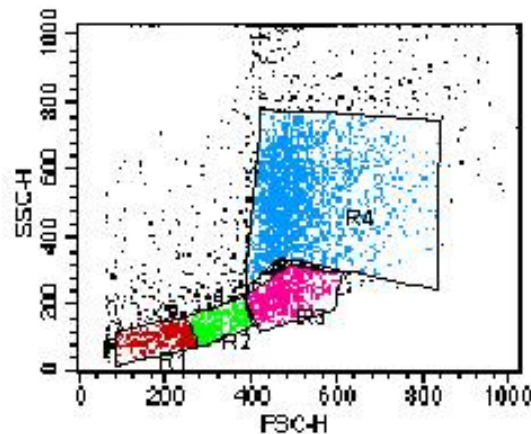


GRÁFICO 1: LOCALIZAÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES NA POPULAÇÃO TOTAL DA MEDULA ÓSSEA

Legenda: SSC - complexidade interna; FSC - tamanho; R1 - população eritrocítica; R2 - população linfocítica; R3 - população monocítica; R4 - população granulocítica.

FONTE: ABUD *et al.*, 2006

2.2 MOLÉCULAS INDICADORAS DE ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A análise morfológica de uma célula indica o seu estado de ativação, sofrimento e morte, mas não se pode chegar a nenhuma conclusão final apenas com esse tipo de avaliação. Para isso outras verificações são necessárias. A análise de expressão enzimática, bem como da produção e liberação de certas moléculas, nos fornecem respostas mais concretas sobre o real estado em que a célula se encontra.

A atividade da enzima fosfatase ácida (AcPase) constitui um indício de ativação celular. Fosfatases ácidas são enzimas lisossomais, sendo também encontradas em outros sistemas membranosos das células. São enzimas digestivas consideradas critérios bioquímicos de ativação celular, principalmente de células fagocíticas. Existem vários subtipos, os quais são diferenciados de acordo com propriedades estruturais, catalíticas e imunológicas e também pela localização celular e distribuição nos tecidos. Dentre as variedades existentes destacamos a lisossomal e a tipo 5 (TRAP). Uma maneira de distingui-las é a exposição ao sal tartarato de sódio, inibidor clássico dessas enzimas, sendo que a TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) é resistente a essa inibição (DREXLER; GIGNAC, 1994). A TRAP se expressa em grande quantidade em células dendríticas,

macrófagos e osteoclastos, estando envolvida na reabsorção óssea. Entretanto o aumento da atividade da TRAP em macrófagos especializados é característica de estados patológicos. Além disso, essa enzima está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio. Um dado interessante é que esses reativos apresentam maior efeito antibacteriano quando na presença da TRAP. Para a geração de ROS ocorre a oxidação e redução do centro férrico da TRAP. Em uma atividade redox o íon ferroso (Fe^{+2}) dessa enzima reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação de Fenton, o que resultará na formação do íon férrico (Fe^{+3}) e radical hidroxila (OH^\cdot). Por sua vez, o íon Fe^{+3} é capaz de reagir com H_2O_2 para formar ânion superóxido (O_2^-) e regenerar íon Fe^{+2} . Logo, a TRAP é capaz de produzir superóxido se existir H_2O_2 suficiente disponível. Nas células dendríticas, além da degradação protéica, a TRAP parece estar envolvida no processo de apresentação de antígenos. Com isso apresentamos mais indícios da ação da TRAP no sistema de defesa do organismo (HAYMAN *et al.*, 2000; HAYMAN *et al.*, 2001; RÄISÄNEN *et al.*, 2005).

Reativos de oxigênio e nitrogênio atuam como mediadores importantes da resposta imunológica, mas não estão envolvidos somente nesse tipo de resposta. Em células precursoras, por exemplo, estão relacionados com a proliferação e a diferenciação celular (XIA; ZWEIER, 1997; PICCOLI *et al.*, 2005; JANG; SHARKIS, 2007).

As enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio pertencem à família NOX. São cadeias transportadoras de elétrons que utilizam o NADPH como doador para reduzir o O_2 em ânion superóxido (O_2^-). Estão localizadas nas membranas biológicas. A geração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do superóxido pode ser espontânea ou acelerada pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Esses reativos são produzidos intracelularmente, onde podem permanecer no interior de vesículas e/ou são liberados para o meio extracelular. O aumento das concentrações intracelulares de ROS é conhecido como *burst* respiratório (BABIOR, 1984; BEDARD; KRAUSE, 2007). A NADPH oxidase (NOX2) foi a primeira isoforma identificada do grupo NOX e está expressa em granulócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e plaquetas. Nos neutrófilos, foi identificada primeiramente na membrana das vesículas celulares. Está localizada nas células-tronco hematopoiéticas, as quais apresentam também a isoforma NOX4.

Os linfócitos B expressam as isoformas NOX2 e NOX5 (PICCOLI *et al.*, 2005; BEDARD; KRAUSE, 2007).

Espécies reativas produzidas durante o *burst* respiratório causam oxidação de ácidos graxos poliinsaturados nas células. Essa oxidação conduz a formação de aldeídos, incluindo o 4-hydroxynonenal (4-HNE) o qual é capaz de induzir proliferação e diferenciação celular (MONEYPENNY; GALLAGHER, 2005).

O óxido nítrico é um mensageiro molecular gerado intracelularmente pela oxidação do aminoácido L-arginina. Essa oxidação ocorre através da ação de enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS). A NOS se localiza na membrana plasmática e apresenta três isoformas as quais se expressam em células da medula óssea e sangue periférico de humanos e roedores. A iNOS (induzível) está presente nos megacariócitos, eosinófilos e monócitos, a eNOS (endotelial) em plaquetas, megacariócitos e linfócitos e nNOS (neuronal) se expressa nos neutrófilos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) apresentam vias de formação diferentes, mas competem pelo mesmo substrato, o superóxido. O NO poderá se ligar ao O_2^- e formar o peroxinitrito ($ONOO^-$). Essa formação é considerada uma atividade de proteção celular contra os danos causados pelos ROS, mas o peroxinitrito também apresenta alta toxicidade sendo que um dos seus principais efeitos nas células é a nitratação de tirosinas (MOULIAN *et al.*, 2001; MICHURINA *et al.*, 2004; JANG; SHARKIS. 2007). A síntese do NO pelas células mononucleares é induzida por citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ (FALZARANO *et al.*, 1996). Essa citocina apresenta papel importante no desenvolvimento de células progenitoras em culturas de curta duração, mas apresenta ação inibitória sobre progenitores em culturas de longa duração (WANG *et al.*, 2003). Portanto é um regulador bifuncional da hematopoiese, em pequenas doses estimula o desenvolvimento de células imaturas enquanto em doses freqüentes e mais altas induz um decréscimo de progenitores (ZHANG *et al.*, 1995).

2.3 HOMEOPATIA

O termo homeopatia é derivado da língua grega e é originado de *Pathos*, vocábulo que corresponde a sofrimento, e *Homoios* que significa semelhante (RUIZ, 1999). É um sistema da medicina desenvolvido pelo médico alemão Samuel Hahnemann (1755 - 1843) que tem como princípio a similaridade ou cura pelo semelhante (ERNST, 2002; BELLAVITE *et al.*, 2005).

Hahnemann descreve em sua obra o princípio da semelhança e, observando que a reação do organismo poderia ser empregada como reação curativa, desde que direcionada no sentido correto, propôs o modelo terapêutico: "todo medicamento capaz de despertar determinados sintomas no indivíduo sadio é capaz de curar esses mesmos sintomas no indivíduo doente" (HAHNEMANN, 2001). A meta da terapia homeopática é promover e orientar os mecanismos de cura do próprio organismo. Um organismo que se cura por conta própria apresenta maiores chances de permanecer saudável, pois curou o problema, evitando a recorrência (JONAS; JACOBS, 1996).

A homeopatia é um sistema de tratamento que se utiliza de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais além de substâncias sintéticas e drogas convencionais, todas em quantidades mínimas, especialmente preparadas e altamente diluídas e sucussionadas (agitação da solução). Essas substâncias são utilizadas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio organismo, de forma abrangente. Devido às altas diluições, não apresentam efeitos tóxicos, produzindo pouco ou nenhum efeito colateral (JONAS; JACOBS, 1996; JONAS *et al.*, 2003).

Uma das maiores polêmicas causadas pela homeopatia é a de se utilizar o medicamento em uma forma tão diluída que, teoricamente, as soluções estariam desprovidas de princípios ativos. O procedimento de diluição mais sucussão é denominado dinamização e o número de vezes que o medicamento foi dinamizado define sua potência. Com a sucussão, acredita-se que as moléculas da substância medicinal sofreriam atrito com as do diluente e, essa operação combinada à diluição, promoveria a liberação dos poderes medicinais latentes no interior da substância bruta (RUIZ, 1999; ERNST, 2002).

A existência de laboratórios que pesquisem a homeopatia é necessária. É importante que pesquisadores realizem estudos sérios e em condições ideais para que consigamos demonstrar para a população a importância e a eficácia desses tratamentos. Sendo assim, será possível mostrar os seus reais benefícios e difundir ainda mais essa promissora terapia.

2.3.1 Complexos altamente diluídos

Há mais de 10 anos, nosso laboratório vem estudando esses complexos os quais são diluídos em água destilada e menos de 1% de álcool. As matrizes são tinturas conhecidas da Farmacopéia Homeopática Brasileira 2ª edição – 1997 e manipuladas na farmácia Homeoterápica sob a responsabilidade do farmacêutico Narciso da Lozzo Neto (CRF-PR 5604). A preparação segue as técnicas homeopáticas de Hahnemann, com dinamizações sucessivas. Todas as sucussões são realizadas manualmente.

O primeiro complexo estudado foi *Aconitum* e associações, codificado em nosso laboratório como M6. Esse complexo é comercializado como Medicamento Canova e, em nossas recentes publicações científicas, denominado de HCM (*homeopathic complex medication*). O M6 apresenta efeitos sobre o sistema imunológico, ativando macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento *in vitro* e *in vivo* (PIEMONTE; BUCHI, 2002) e alterando a atividade fagocítica dessas células através da estimulação do sistema endossomal/lisossomal (LOPES *et al.*, 2006). Também apresenta efeitos sobre a infecção experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo* por *Leishmania amazonensis* e *Paracoccidioides braziliensis*, controlando a progressão e limitando a sua disseminação (PEREIRA *et al.*, 2005; TAKAHACHI *et al.*, 2007). Efeitos modulatórios também foram encontrados em estudos com camundongos portadores de Sarcoma 180 tratados, os quais mostraram redução da massa tumoral e o aumento significativo do infiltrado linfocitário, após tratamento *in vivo*. Aumento dos linfócitos T CD4, B e *natural killer* (NK) também foram observados nesses animais (SATO *et al.*, 2005). O tratamento também proporcionou aumento da atividade das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Outra característica importante desse medicamento é a não toxicidade nem

mutagenicidade identificável em nível cromossômico (SELIGMANN *et al.*, 2003). A alteração das células sanguíneas após o tratamento (SATO *et al.*, 2005) nos encorajou a estudar a fonte dessas células, a medula óssea. Esse complexo agiu nas células medulares tanto após tratamento *in vitro* quanto *in vivo*, estimulando a aderência celular e contribuindo para a formação de ninhos, locais que permitem a proliferação e/ou diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas (ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2007; CESAR *et al.*, 2009). Estudos clínicos realizados em pacientes HIV⁺ demonstraram uma diminuição de doenças oportunistas e melhora na qualidade de vida, novamente indicando uma ação modulatória desse complexo sobre o sistema imunológico (Di BERNARDI, 2005; STROPARO, 2005). A análise da expressão gênica de macrófagos demonstrou alterações na expressão de diversos genes relacionados ao sistema imunológico bem como à citoproteção, após o tratamento *in vivo* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). O tratamento com esse complexo ocasionou ativação indireta de linfócitos, através de macrófagos. A imunoestimulação dos linfócitos resultou em um aumento da atividade tumoricida dessas células contra linhagem celular de melanoma (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Devido à ação imunomoduladora, esse complexo é indicado para pacientes que apresentam doenças depressoras do sistema imunológico como, neoplasias. Esses resultados demonstram a importância do estudo desse complexo e também a necessidade de estudar novos complexos, com o intuito de se obter novas opções de terapias. Os novos complexos utilizados em nosso laboratório estão descritos a seguir: *Chelidonium* e associações (M1); *Canela* e associações (M2); *Curcuma* e associações (M4); *Gelsemium* e associações (M5); *Calcarea* e associações (M8). Resultados recentes nos mostraram que o tratamento com M8 diminui o volume e o número dos nódulos tumorais de animais portadores de melanoma pulmonar (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Dessa maneira salientamos a importância da continuidade desses estudos com o objetivo de se obter novas possibilidades de terapias bem como alternativas que complementem tratamentos alopáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS

As células utilizadas nesse trabalho foram:

3.1.1 Células de medula óssea de camundongos

Foram analisadas células de medula óssea retiradas de camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços machos, de 3 meses de idade, pesando entre 25 e 35g, mantidos sob temperatura ideal e que receberam água e ração *ad libitum*. Foram utilizados também camundongos *black* da cepa C57BL/6 (para ensaios com o modelo de melanoma), nas mesmas condições que os anteriores. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA N° 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N° 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, certificou que os procedimentos utilizando animais neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* (Canadian Council on Animal Care) (ANEXO 1).

3.1.1.2 Coleta celular

Em cada experimento foram utilizados, no mínimo, 5 camundongos para que se obtivesse um *pool* celular, os quais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Os fêmures direito e esquerdo foram retirados, limpos, levados para o fluxo laminar onde as epífises foram cortadas e a medula retirada com 2 ml de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), acrescido de soro fetal bovino na concentração de 10% (v/v). Essa suspensão celular foi transferida para tubo de centrifuga, os grumos desfeitos e então centrifugada a 2.800 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em 10 ml de meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer.

3.1.2 Linhagem celular leucêmica - K-562

A linhagem leucêmica K-562 (leucemia eritroblástica crônica humana) foi originalmente obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). Essa linhagem é mantida congelada em tanques de N₂ líquido. Em cultura, são células em suspensão e são mantidas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino com antibióticos, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após contagem em câmara de Neubauer estas células foram plaqueadas para a realização dos experimentos.

3.1.3 Macrófagos peritoneais de camundongos

Foram utilizados macrófagos de camundongos albinos suíços, já citados. Após o sacrifício, o peritônio destes animais foi exposto, injetados 10 ml de *Phosphate Buffer Solution* (PBS) gelado estéril, e, com uma seringa, o lavado foi retirado, transferido a um tubo de centrifuga estéril e acondicionado em gelo para impedir a aderência das células à parede do tubo. Quando necessário, os tubos foram centrifugados durante 2 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante desprezado e os *pellets* ressuspensos. Uma alíquota foi retirada e as células contadas em Câmara de Neubauer.

3.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS

Para determinação do número de células realizou-se uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular, em líquido de Turck - ácido acético 2% (v/v) com violeta genciana - Newprov[®], o qual é utilizado para hemólise dos eritrócitos. A concentração de células leucêmicas e dos macrófagos foi determinada da mesma maneira, substituindo o líquido de Turck por PBS. O número de células das amostras foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz - Nikon[®] Eclipse E-200.

3.3 CULTIVO CELULAR (CULTURA DE CURTA DURAÇÃO)

As células foram cultivadas em garrafas ou placas multipoços estéreis - TPP® e os cultivos celulares mantidos em incubadora *Hotpack*® a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante o período determinado para cada experimento. Como meio de cultura padrão, foi utilizado DMEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) termoinativado, 200 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2,6 µg/ml de anfotericina.

3.4 COMPOSTOS UTILIZADOS

Neste trabalho foram utilizados complexos altamente diluídos, codificados em nosso laboratório e, de acordo com essa codificação, serão denominados durante o trabalho:

- M1 (*Chelidonium majus* e associações);
- M2 (*Cinnamon* ou *Cinnamomum verum* e associações);
- M4 (*Curcuma longa* e associações);
- M5 (*Gelsemium sempervirens* e associações);
- M6 (*Aconitum napellus* e associações); esse complexo é comercializado como Medicamento Canova e, em nossas recentes publicações científicas, denominado de HCM (*homeopathic complex medication*);
- M8 (*Calcareo carbonica* e associações);
- M3 ou HS (solução hidroalcoólica) - o diluente dos compostos (0,01% de álcool neutro em água destilada) utilizada como um dos controles.

3.5 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS - M-CSF

Em alguns experimentos este fator foi utilizado como controle positivo. Essa citocina foi produzida por fibroblastos tumorigênicos de camundongos (células L929) e cedida gentilmente pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

3.6 TRATAMENTOS UTILIZADOS

3.6.1 Tratamento *in vitro*

O tratamento foi efetuado na concentração de 20% (v/v) em relação ao meio de cultura 3 horas após o plaqueamento celular. Após 24 horas de cultivo, foi realizado o reforço do tratamento, adicionando-se mais 1% do complexo em relação ao meio de cultura. Estas doses de reforço foram adicionadas diariamente até o término dos experimentos e os compostos eram sucussionados antes de qualquer tratamento. Abaixo, estão citados os grupos analisados nestes experimentos:

- grupo controle - constitui-se de células que não receberam tratamento algum;
- grupo controle dos complexos - tratamento com a solução hidroalcoólica;
- grupo controle positivo - tratamento com o M-CSF;

Essas duas últimas soluções foram utilizadas da mesma maneira que os compostos, mas o M-CSF não foi sucussionado.

- grupos tratados - as células pertencentes a esses grupos receberam os compostos, da maneira já citada;

3.6.2 Tratamento *in vivo*

3.6.2.1 Tratamento através de injeção subcutânea

Esse tipo de tratamento, injetável, foi utilizado apenas na época inicial dos experimentos. Os animais eram tratados durante 7 dias e foram utilizados 5 animais por grupo de tratamento. A seguir os grupos analisados:

- grupo controle - não foi administrada nenhuma substância nestes animais;

- grupo controle dos complexos - foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g de HS a cada 24 horas;
 - grupo tratado com o M6 - foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g do composto a cada 24 horas;
 - grupo tratado com o M-CSF - foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g de M-CSF estéril a cada 24 horas;
 - grupo tratado com M-CSF mais M6 - foram administradas injeções subcutâneas de 3,5 µl/g de M-CSF estéril mais 3,5 µl/g do composto, a cada 24 horas;
- OBS: tanto o M6 como a HS foram sucussionados antes de cada aplicação.

3.6.2.2 Tratamento através da água de beber

Para esse estudo foram adquiridas mamadeiras, grades e gaiolas novas. Também se utilizou maravalha autoclavada. Os camundongos foram pesados e divididos em grupos de 10, portanto 8 grupos foram estabelecidos: grupos M1; 2; 3 (HS); 4; 5; 6 e 8. O grupo 7 recebeu apenas água mineral da marca Ouro Fino® (controle). Os animais foram codificados da mesma maneira que as soluções de tratamento (duplo-cego) e receberam os complexos na água de beber. Os tratamentos foram realizados durante 7 dias, todos os dias, por volta das 18 horas, levando-se em consideração o hábito noturno desses animais. No momento do tratamento as soluções (faltando uma diluição para se obter o produto final) foram sucussionadas e misturadas à água mineral nas mamadeiras (última diluição do medicamento). As soluções foram sucussionadas novamente, imediatamente antes de serem colocadas nas gaiolas. No dia posterior, todas as mamadeiras eram retiradas e medida a solução restante. No 8º dia, os animais foram pesados novamente e então sacrificados por deslocamento cervical.

3.6.2.3 Tratamento através de inalação

Os camundongos C57BL/6 receberam 5×10^5 células de melanoma murino B16F10 em DMEM sem soro através da veia caudal (modelo experimental de melanoma metastático). Os animais do grupo controle não receberam células tumorais. Após 24 horas da inoculação, os animais foram tratados por 15 dias e o

tratamento consistiu na inalação dos complexos a cada 12 horas durante 10 minutos em câmara inalante modificada, acoplada a um inalador convencional Inalar - NS[®], adaptada conforme descrito por McConville *et al.*, 2005, para tratamento inalante de pequenos roedores em ensaios *in vivo* (FIGURA 4).

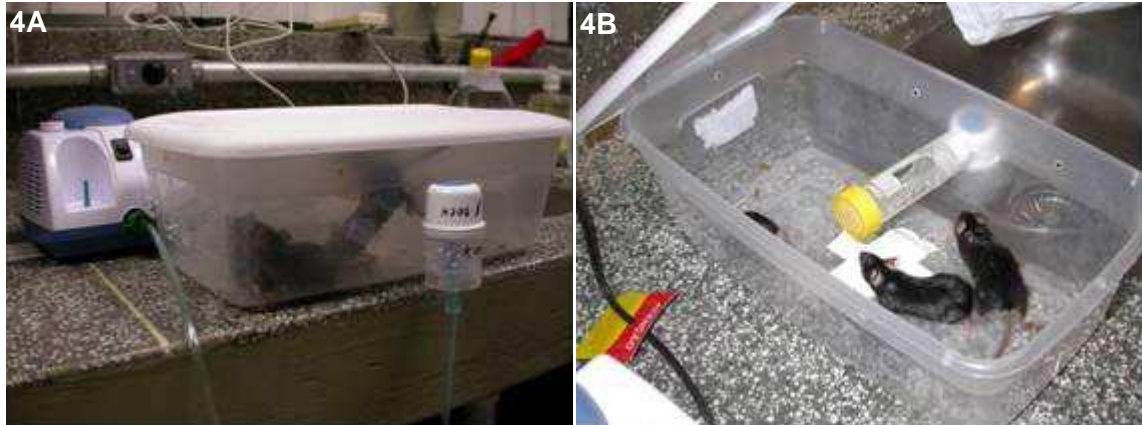


FIGURA 4 - CÂMARA INALANTE

Legenda: A câmara foi adaptada conforme McConville *et al.*, 2005 a um inalador convencional para o tratamento por via respiratória. Os tratamentos foram realizados na câmara em grupos de até 5 animais, durante 10 minutos a cada 12 horas, por 15 dias. Cada grupo possuiu câmara e acessórios exclusivos para cada tratamento.

FONTE: GUIMARÃES, 2009

Os grupos de análise deste experimento foram os seguintes:

- grupo controle negativo (controle) - esses animais não receberam células da linhagem B16F10 e tratamento;
- grupo controle positivo (tumor) - esses animais receberam células B16F10, mas não receberam tratamento;
- grupo tratado com HS - esses animais receberam células B16F10 e foram tratados com essa solução da maneira já citada;
- grupo tratado com M1 e grupo tratado com M8 - esses animais receberam células B16F10 e foram tratados com os respectivos compostos.

3.7 EXPERIMENTOS REALIZADOS

3.7.1 Células de medula óssea de camundongos

3.7.1.1 Citoquímica para fosfatase ácida *in vitro* e *in vivo* através de injeção subcutânea

Para demonstrar a atividade da fosfatase ácida total (AcPase) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) *in vitro*, as células medulares foram mantidas em cultura por 96 horas, em placas de 24 poços contendo lamínulas. Para demonstrar a atividade *in vivo*, as células foram coletadas e já processadas. Nesse experimento utilizou-se o sistema comercial *Diagnostics Acid Phosphatase* (SIGMA® - n°386-A), segundo instruções do fabricante (ANEXO 2). Após a montagem das lâminas, as células foram analisadas no microscópio Nikon® Eclipse E-200 e as imagens foram capturadas pela câmera digital Nikon® Coolpix 4.500.

3.7.1.2 Liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) *in vitro*

3.7.1.2.1 Liberação de ânion superóxido (O_2^-)

As células medulares foram coletadas, tratadas e mantidas em cultura como descrito anteriormente, por 48, 72 e 96 horas. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços e em cada poço foram adicionadas 5×10^5 células/ml. A produção de O_2^- foi quantificada pelo método baseado na redução extracelular do citocromo c, segundo o método de Sasada, Pabst e Johnston, 1983 (ANEXO 3). A redução do citocromo c foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas (BIORAD) utilizando filtro de comprimento de onda de 550 nm. A quantidade de citocromo c reduzido, correspondente à quantidade de O_2^- liberado, foi calculada usando um coeficiente de extinção molar diferencial de $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e estes resultados serão apresentados em nmoles de $O_2^-/10^6$ células.

3.7.1.2.2 Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As células medulares foram coletadas, tratadas e mantidas em cultura em placas de 96 poços, por 48, 72 e 96 horas, da maneira já descrita. Foram utilizadas 5×10^5 células/ml por poço. A produção de H_2O_2 foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H_2O_2 , dependente de peroxidase, segundo o método de Pick e Mizel, 1981. Após os tempos de cultura determinados foi realizada a mensuração da liberação desse reativo de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 4. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica (D.O.) e apresentados em nmoles de H_2O_2 / 10^6 células. Para a obtenção de um padrão, foi feita uma curva de concentração de H_2O_2 utilizando peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml - SIGMA[®]) com a concentração final de 15U/ml. Foram feitas três soluções de H_2O_2 nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. A concentração dessas soluções foi determinada através de sua absorbância em 240 nm, sendo o resultado utilizado em um coeficiente de $39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Diluições apropriadas da solução estoque foram usadas para a determinação do H_2O_2 produzido pelas células medulares em cultura, segundo o método de Pick e Keisari, 1980. A absorbância dessas diluições foi lida em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi utilizado para confeccionar a curva padrão.

3.7.1.2.3 Liberação de óxido nítrico (NO)

As células medulares foram coletadas, tratadas e mantidas em cultura como descrito acima, por 48, 72 e 96 horas. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços e em cada poço foram adicionadas 5×10^5 células/ml. Após os tempos de cultura já citados, a avaliação da produção de óxido nítrico foi determinada indiretamente a partir da determinação da concentração de nitrito (NO_2^-), o qual é um produto estável da reação de produção de NO, no sobrenadante das culturas, de acordo com o protocolo descrito por Green e colaboradores em 1982 (ANEXO 5). Alíquotas de 100 μ l de cada sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços e misturadas em igual proporção com o reagente de Griess* que, na presença

de nitrito, reage para produzir uma cor lilás. A densidade óptica de cada amostra foi determinada em leitor de microplacas (BIORAD) em 550nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e apresentados em μmoles de NO/ 10^6 células. A concentração de nitrito presente no sobrenadante das amostras foi calculada com base nos valores de D.O. obtidos para cada concentração ($10\mu\text{M}$ - $160\mu\text{M}$) de uma curva padrão, confeccionada com a utilização de uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) diluído em meio de cultura, em concentração conhecida (16mM). *(Naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5% na proporção de 1:1).

Os dados de todos os testes do item 3.7.1.2 foram submetidos a análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) para determinar a significância estatística entre os grupos comparados. Os dados são representativos de três experimentos, em quadruplicatas, independentes.

3.7.1.3 Verificação da presença de nitroproteínas *in vitro*

Os resultados sugeriram a ocorrência de nitração de proteínas das células medulares. A presença de proteínas nitrosiladas indica a formação do reativo peroxinitrito pelas células. Para essa análise as células medulares foram coletadas, tratadas e mantidas em cultura como descrito acima, por 96 horas. Escolheu-se esse tempo de cultura, pois foi quando se detectou a menor quantidade de NO. Foram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm^2 e as células foram adicionadas na concentração de 8×10^7 células/ml. Após 72 horas adicionamos meio de cultura e meio de incubação às células, como descrito a seguir:

- grupo controle - meio de cultura;
- grupo controle com meio de incubação - meio de cultura + LPS + $\text{INF}\gamma$;
- grupo tratado com M6 - meio de cultura e tratamento;
- grupo tratado com M6 e presença de meio de incubação - meio de cultura + LPS + $\text{INF}\gamma$ e tratamento;

Após 24 horas de incubação (96 horas de cultura) as células foram processadas de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 6 para obtenção do

extrato protéico, plotagem das amostras em membrana de nitrocelulose (Amersham-Biosciences®) e revelação da membrana.

3.7.1.4 Produção de Citocinas *in vitro*

Para esse experimento mantivemos as células em cultura por 96 horas e utilizamos placas de 24 poços, contendo poços controles e tratados como descrito anteriormente. O objetivo desse experimento foi a detecção e quantificação das citocinas produzidas pelas células medulares, as quais são liberadas no sobrenadante da cultura. Utilizamos o sistema comercial *Mouse Th1/Th2 cytokine CBA* (BD/Pharmingen), o qual contém anticorpos contra as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, INF- γ e TNF- α . A incubação foi realizada de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 7 e a presença de citocinas foi verificada pelo FACSCalibur. Os resultados foram adquiridos e analisados de acordo com as instruções do sistema. Realizamos 3 experimentos independentes e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$).

3.7.1.5 Imunofenotipagem *in vitro* e *in vivo* através da água de beber

Para análise *in vitro* utilizamos garrafas de cultivo de 25 cm² (8×10^7 células/ml) e as células foram mantidas em cultura por 96 horas. O objetivo deste experimento foi avaliar as populações celulares presentes no sobrenadante da cultura. Após o tempo determinado, a cultura foi interrompida e as células imunomarcadas de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 8. Para a análise da ação dos complexos *in vivo*, imediatamente após a coleta, as células foram fixadas e o processamento realizado da mesma maneira que para os experimentos *in vitro*. Realizou-se então a imunofenotipagem pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur equipado com o laser de íon argônio (488nm), detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e complexidade interna (SSC – *side scatter*) e detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (>670 nm). Um total de 10.000 eventos foi verificado pelo aparelho e foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1%

da linha limite. Os dados foram analisados pelo *software Cell Quest* e adquiridos na forma linear para o parâmetro dispersão e na forma logarítmica para o parâmetro fluorescência.

Nesse ensaio utilizamos cinco anticorpos do sistema *Mouse Lineage Panel* (BD/Pharmingen) e o anti-CD11c (marcador de células dendríticas) (BD/Pharmingen). Os anticorpos que compõem o sistema são: anti-CD3 ϵ (marcador de linfócitos T – esse anticorpo é específico para a cadeia epsilon do complexo CD3); anti-CD45R (B220) (marcador de linfócitos B); anti-CD11b (Mac-1) (marcador de monócitos/macrófagos); anti-Ly6G (Gr-1) (marcador da série granulocítica); anti-TER-119 (Ly76) (marcador da série eritrocítica). Todos os anticorpos primários eram biotinilados. Como segundo passo, usou-se estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina (PE). A estreptavidina apresenta afinidade pela biotina presente nos anticorpos primários, funcionando como um revelador. A ficoeritrina foi detectada pelo canal FL2. Realizamos 3 experimentos independentes e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$).

3.7.1.6 Avaliação da peroxidação lipídica realizada pelas células após tratamento *in vivo* através da água de beber

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por Nourooz-Zadeh *et al.*, (1994) aplicado ao extrato metanólico das amostras. Este método quantifica a formação de hidroperóxidos por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam íon ferroso a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja. Após a obtenção das células medulares, alíquotas de 10^7 células de cada grupo de tratamento foram separadas e processadas segundo o protocolo descrito no ANEXO 9. Para a determinação da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (trifenilfosfina - SIGMA[®]) (sem hidroperóxidos lipídicos), do valor da absorbância das amostras sem TPP. O valor obtido foi então interpolado na curva padrão de peróxido de hidrogênio, a qual foi obtida com soluções padrão de peróxido de hidrogênio, de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 μM) submetidas aos mesmos

procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção do tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/ml) pela concentração de proteínas (mg/ml), obtendo-se assim o valor de hidroperóxidos por quantidade de proteínas no sobrenadante do extrato (nmol de hidroperóxidos/mg de proteínas).

OBS: O valor obtido dessa subtração é referente apenas a quantidade de íons ferrosos (Fe^{2+}) oxidados por hidroperóxidos lipídicos.

3.7.1.7 Imunofenotipagem das células medulares de camundongos C57BL/6 após tratamento *in vivo* por via inalatória

Após 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados. Órgãos e células desses animais foram processados e analisados (GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010). Aqui serão demonstrados apenas os resultados obtidos com a análise das células medulares. A coleta e obtenção das células foram realizadas da maneira já citada. O processamento e imunomarcagem das células foram realizados de acordo com o ANEXO 8. A aquisição e análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur da maneira já citada e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$).

3.7.1.8 Imunomarcagem de Conexina 43 *in vitro*

Para esses experimentos foram utilizadas garrafas de cultivo de 25 cm^2 (8×10^7 células/ml), as células foram mantidas em cultura por 96 horas e tratadas. O objetivo deste experimento foi a avaliação das populações celulares presentes no sobrenadante e também aderentes. Após o tempo determinado, a cultura foi interrompida e as células imunomarcadas (ANEXO 10). Foi realizada, então, a aquisição e análise da presença de conexina 43 pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur da maneira já citada. Os anticorpos utilizados foram anti-conexina 43 (BD/Pharmingen®) e o anticorpo secundário anti *mouse* IgG conjugado com fluoresceína (FITC). A fluoresceína foi detectada pelo canal FL1. Realizamos 3

experimentos independentes e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$).

3.7.2 Células medulares e macrófagos peritoneais de camundongos em co-cultura

Para esse experimento utilizou-se placas *transwell* (COSTAR®) modelo número 3413 apresentando membranas com tamanho de poro de $0,4\mu\text{m}$. As células da medula óssea foram mantidas nos poços inferiores (2×10^6 células/ml por poço) e os macrófagos peritoneais nos poços superiores separados pela membrana (10^5 células/ml por poço). Dessa maneira pudemos visualizar como essas células se comportaram depois de co-cultivadas por 96 horas. Apenas os macrófagos peritoneais foram tratados diretamente, na concentração de 20% em relação ao meio de cultura (v/v). A seguir será mostrado o desenho esquemático da placa de co-cultura.

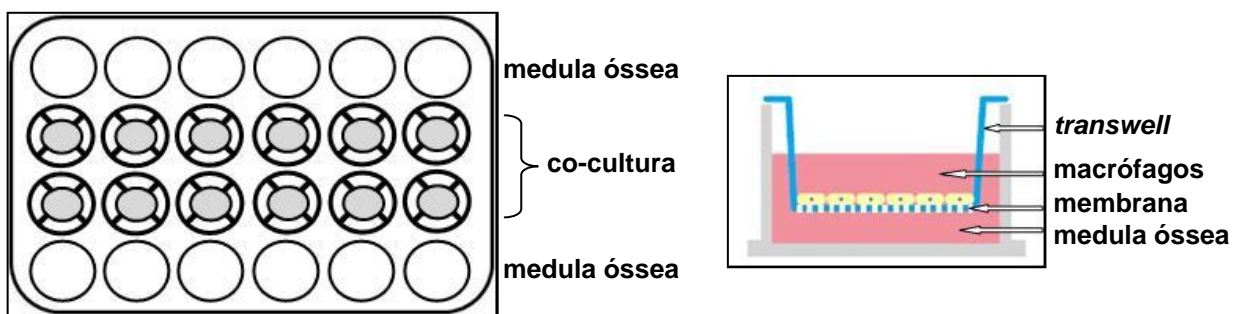


FIGURA 5 - PLACA DE CO-CULTURA E DETALHAMENTO DO POÇO CONTENDO O TRANSWELL

Para essa verificação realizamos as seguintes análises:

3.7.2.1 Citometria de fluxo

Neste momento foram analisadas as células aderentes e sobrenadantes da medula óssea. Após 96 horas de co-cultura as células aderentes foram retiradas da placa com jatos de PBS gelado. O processamento dessas células bem como das sobrenadantes ocorreu da mesma maneira que para a imunofenotipagem (ANEXO 8), sendo que agora o anticorpo utilizado foi apenas o anti-CD11b (Mac-1) biotinilado (marcador de monócitos/macrófagos) (BD-Pharmingen). Os resultados foram

adquiridos e analisados com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur, da maneira já citada.

3.7.2.2 Microscopia confocal

Neste experimento foi analisada a população aderente da medula óssea, sendo que o processamento ocorreu de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 11. O anticorpo utilizado foi o anti-CD11b. Como segundo passo, usou-se estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina. O núcleo das células foi corado com DAPI (4,6 - diamidino - 2 - fenilindole, dihidroxicloride) na concentração de 1,5 µg/ml. Após o experimento, as células foram analisadas com auxílio do Microscópio Confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E800 (Nikon®). A ficoeritrina foi excitada pelo laser de íon argônio a 488nm e o DAPI pelo laser *blue diode* a 350 nm. Nesse experimento analisamos células de medula óssea que não estiveram em co-cultura com macrófagos, para se obter uma comparação. Na citometria de fluxo isso não foi necessário, pois já possuíamos esse ensaio.

3.7.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células analisadas foram os macrófagos peritoneais de camundongos. Após 96 horas de cultura as células foram processadas seguindo o protocolo de rotina (ANEXO 12), e analisadas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM - 6360 LV SEM, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.7.3 Células da linhagem eritroblástica leucêmica K-562

3.7.3.1 Verificação da viabilidade celular e apoptose

Através desse experimento verificou-se a toxicidade dos complexos sobre as células da linhagem leucêmica K-562, através da citometria de fluxo. Com isso foi possível realizar a quantificação das células vivas e viáveis após o tratamento. As células foram plaqueadas em placas multipoços de 24 poços (10^6 células/ml). Após

o plaqueamento esperou-se 24 horas para começar o tratamento, para que as células se estabelecessem na cultura. O tratamento ocorreu como já descrito para os experimentos *in vitro*. Após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e processadas de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 13. Para esse experimento utilizamos o sistema comercial *Annexin V- FITC Apoptosis Detection* (BD/Pharmingen®). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) para determinar a significância estatística entre os grupos comparados. Os dados são representativos de três experimentos independentes em triplicata.

3.7.3.2 Verificação da proliferação celular

Com esse experimento foi possível verificar o índice de proliferação celular da linhagem K-562 após tratamento, através de citometria de fluxo. As células foram plaqueadas, cultivadas e tratadas da mesma maneira descrita para o experimento de viabilidade celular. Após 48 horas de cultivo as células foram lavadas com PBS e processadas de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 14. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA - fator único) seguida de teste de Tukey ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$) para determinar a significância estatística entre os grupos comparados. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1 CITOQUÍMICA PARA FOSFATASE ÁCIDA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

As células medulares apresentaram reação positiva para atividade da fosfatase ácida total (AcPase) e da resistente ao tartarato (TRAP), em todos os grupos analisados. A especificidade da reação foi comprovada através do grupo controle da reação enzimática. Nesse grupo não foi adicionado o substrato da enzima e ainda adicionou-se fluoreto de sódio (inibidor de AcPase) (FIGURA 6). Essas células não apresentaram nenhuma marcação.

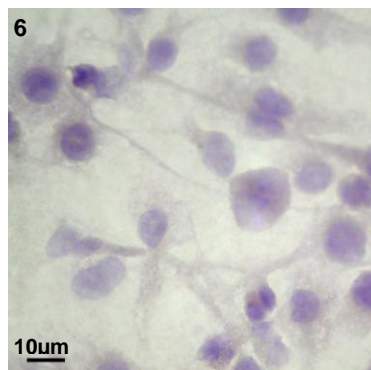


FIGURA 6 - CONTROLE DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

Legenda: Células aderentes de medula óssea (*in vitro*). Não foi observada marcação positiva para este grupo de células processadas como grupo controle da reação enzimática. Foi realizado grupo controle da reação para as células sobrenadantes bem como para o experimento *in vivo*, sendo que o resultado foi o mesmo. Barra equivalente a 10µm.

A análise das células medulares aderentes *in vitro* demonstrou diferença da atividade das enzimas entre os grupos analisados. A fosfatase ácida total apresentou uma marcação de cor avermelhada à púrpura, (FIGURA 7). Nota-se também que tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados a AcPase se distribui por toda a célula, embora esteja em maior quantidade nos grupos tratados (FIGURA 7A e B). As células pertencentes aos outros grupos de tratamento (M-CSF e M6 + M-CSF) mostraram-se mais marcadas que o grupo controle, entretanto, com menor ou marcação semelhante ao grupo M6 (imagens não mostradas). O resultado foi o mesmo para as células sobrenadantes (FIGURA 7C e D).

Com relação às células aderentes, a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é menor nos grupos tratados (FIGURA 8A e B). Essa marcação

apresenta uma cor marrom avermelhada e também se distribui por todo o citoplasma, mas em menor quantidade que a AcPase. As células sobrenadantes se apresentaram de maneira diferente das aderentes, ou seja, as células tratadas demonstraram maior atividade enzimática que as controles (FIGURA 8C e D). Portanto observou-se que a população sobrenadante da medula óssea apresenta maior atividade tanto da AcPase quanto da TRAP após tratamento *in vitro* com M6.

Os resultados do experimento *in vivo* (população total) demonstraram maior atividade da AcPase nos grupos tratados quando comparados ao controle. Com a relação à TRAP os grupos tratados apresentaram menor marcação que o grupo controle (FIGURA 9). É interessante ressaltar que os resultados dos experimentos *in vivo* repetiram os das células aderentes tratadas *in vitro*.

Abaixo mostraremos uma tabela com o resumo dos resultados obtidos.

TABELA 1 - RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DA AcPase E TRAP

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
CONTROLE	++	++++	+++	+++	+++	++
M6	++++	+++	++++	++++	++++	+

Legenda: A quantidade de + indica a intensidade da marcação. Grupo 1: AcPase *in vitro* - células aderentes; 2: TRAP *in vitro* - células aderentes; 3: AcPase *in vitro* - células sobrenadantes; 4: TRAP *in vitro* - células sobrenadantes; 5: AcPase *in vivo*; 6: TRAP *in vivo*.

IMAGENS DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA TOTAL (AcPase) *in vitro*

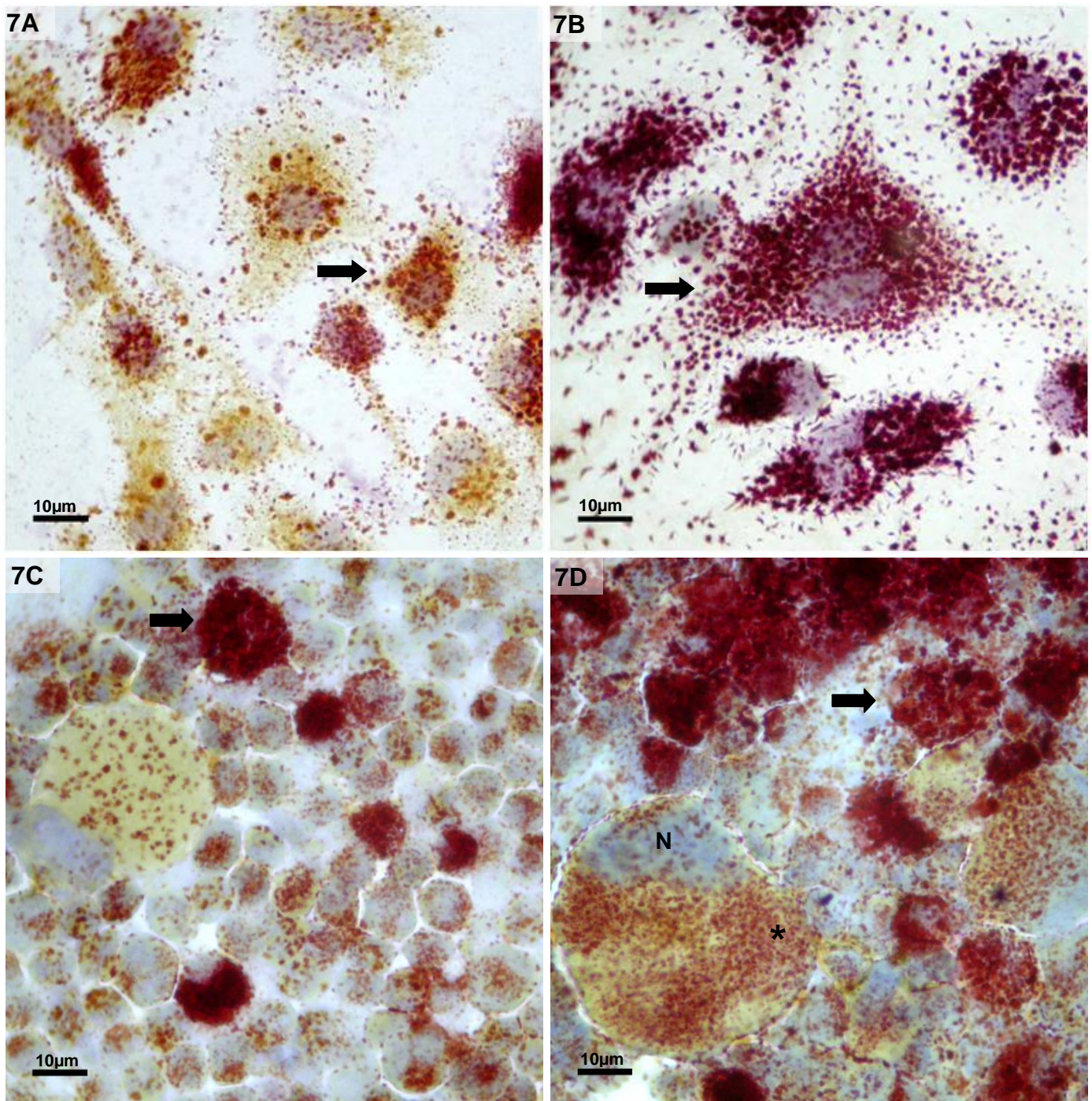


FIGURA 7 - AcPase *IN VITRO*

Legenda: A-B - células aderentes e C-D - células sobrenadantes; A-C - grupo controle (menor marcação), B-D - grupo M6 (maior marcação); setas - marcação positiva, * - megacariócito apresentando reação positiva para a enzima; **N** - núcleo corado com hematoxilina. Objetiva utilizada: 100x. Barras equivalentes a 10µm.

IMAGENS DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP) *in vitro*

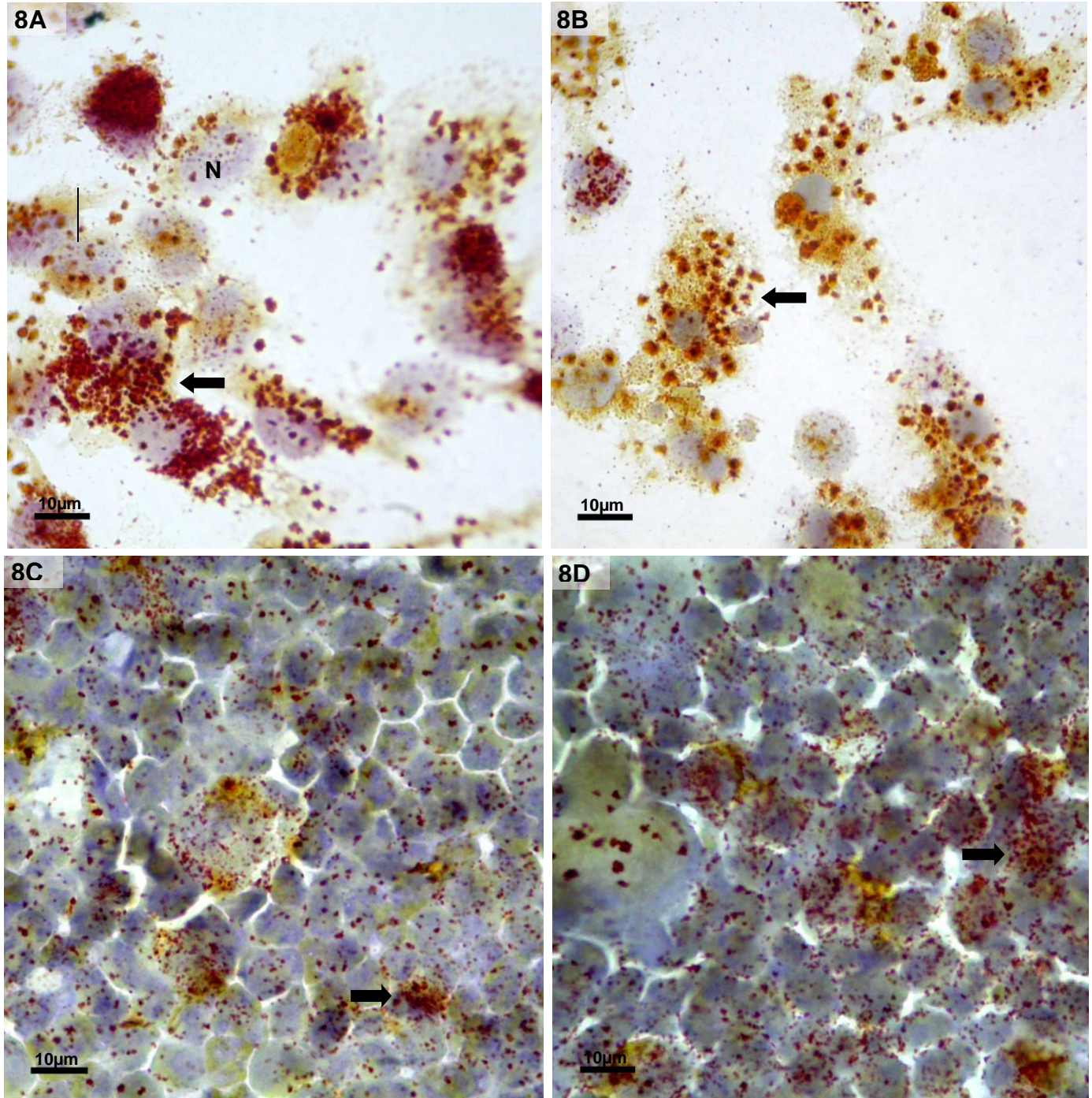


FIGURA 8 - TRAP *IN VITRO*

Legenda: A-B - células aderentes e C-D - células do sobrenadante; A-C - grupo controle (maior marcação nas aderentes), B-D - grupo M6 (maior marcação nas sobrenadantes); setas - marcação positiva; **N** - núcleo corado com hematoxilina. Objetiva utilizada: 100x. Barras equivalentes a 10µm.

IMAGENS DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA TOTAL (AcPase) E RESISTENTE AO TARTARATO (TRAP) *in vivo*

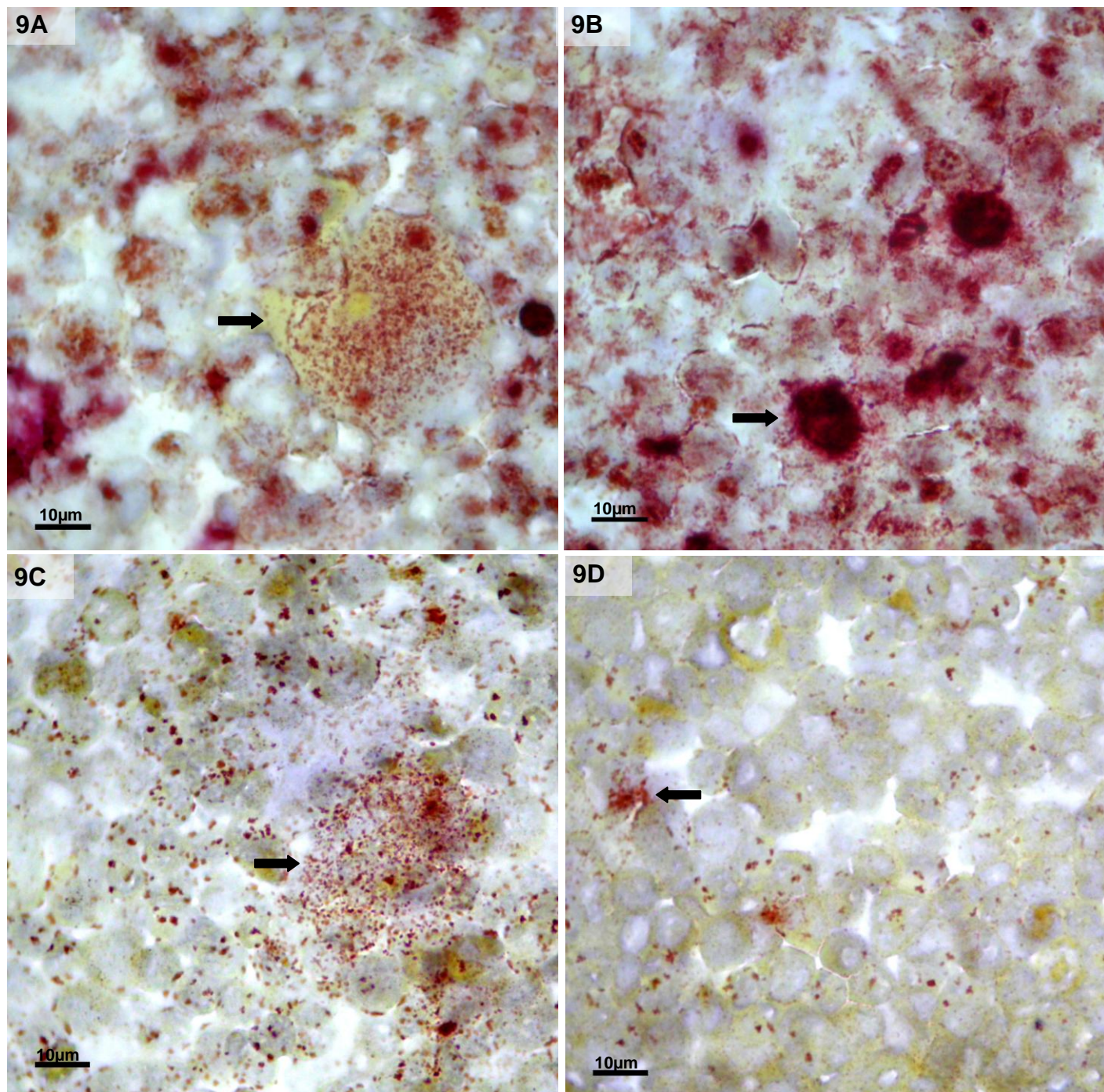


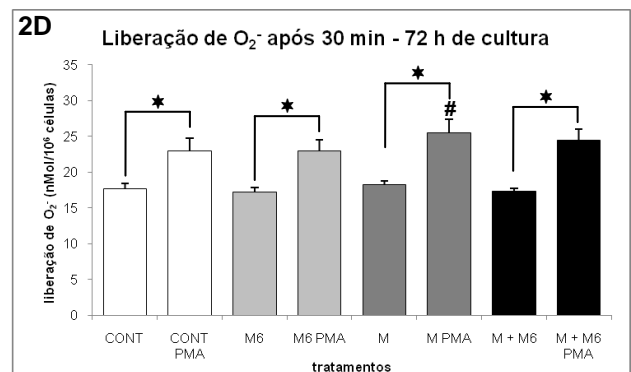
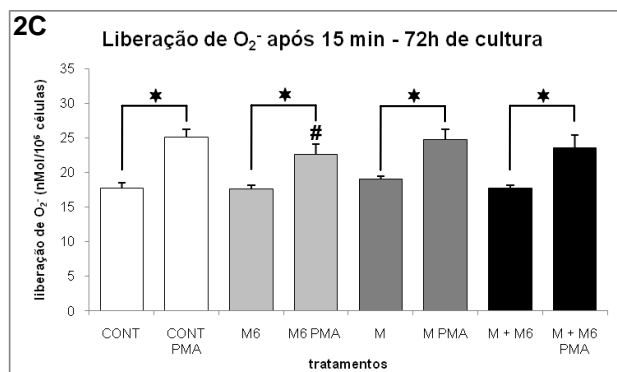
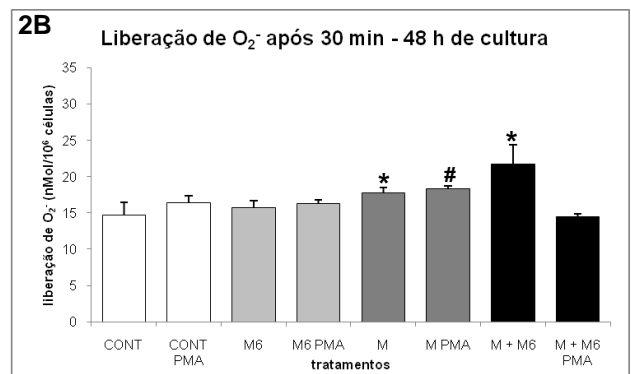
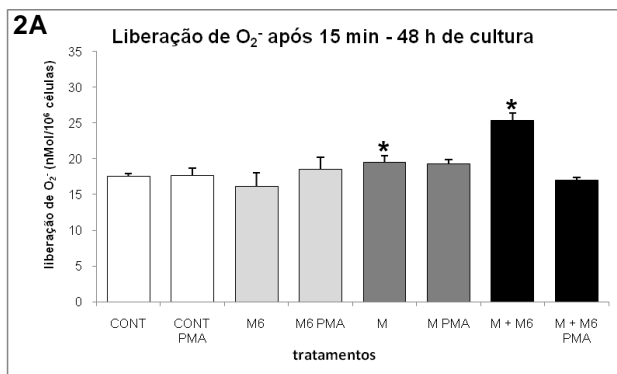
FIGURA 9 - AcPase e TRAP *IN VIVO*

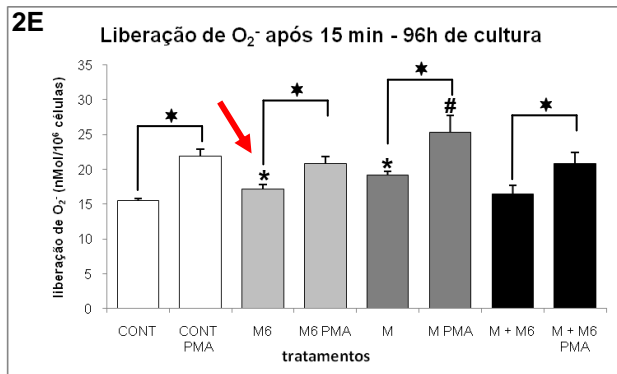
Legenda: A-B - AcPase e C-D - TRAP; A - grupo controle (menor marcação) B - grupo M6 (maior marcação); C - grupo controle (maior marcação) D - grupo M6 (menor marcação); setas - marcação positiva. Objetiva utilizada: 100x. Barras equivalentes a 10µm.

4.2 LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E NITROGÊNIO (RNS) PELAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

Neste trabalho, a liberação desses reativos foi analisada após 48, 72 e 96 horas de cultura. É importante ressaltar que essa análise foi realizada em culturas contendo a população total da medula óssea.

O tratamento com M6 estimulou significativamente a liberação O_2^- no sobrenadante das culturas, em relação ao grupo controle, após 96 horas. O PMA, ativador clássico da enzima NADPH oxidase e utilizado como controle positivo para liberação de espécies reativas de oxigênio, apresentou ação significativa apenas após 72 horas de cultura. Aparentemente as células precisam estar mais estabelecidas na cultura para que esse composto seja efetivo na liberação de O_2^- . É importante ressaltar que os resultados foram semelhantes após 15 e 30 minutos de incubação.





*, # e * $p < 0,05$

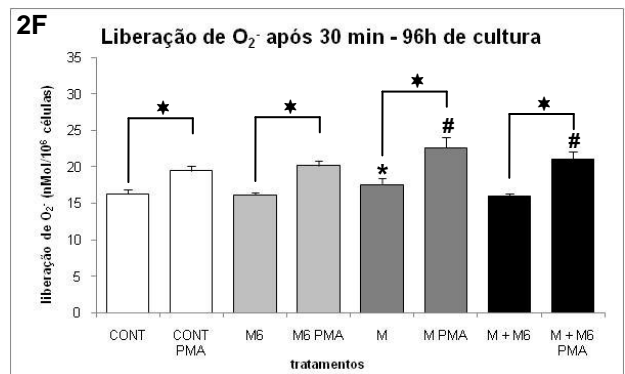
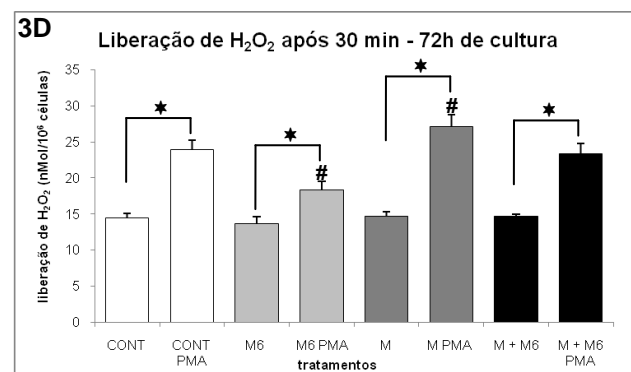
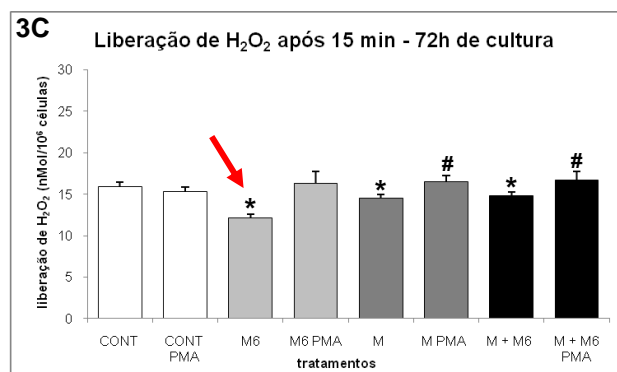
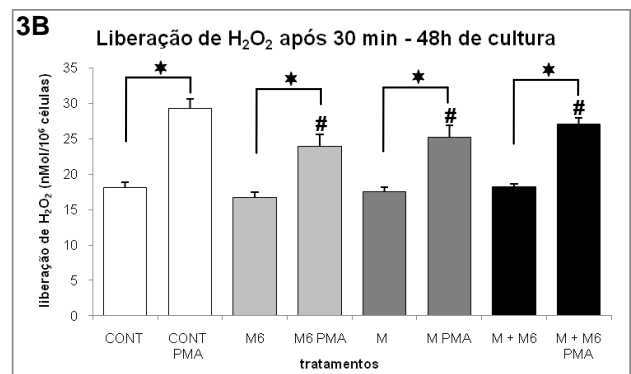
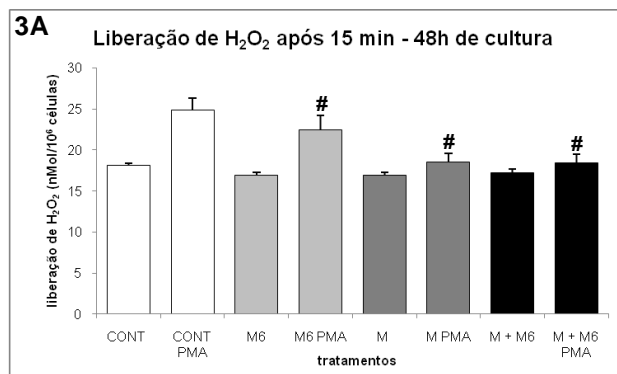


GRÁFICO 2 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

Legenda: A-B - após 48 horas, C-D - após 72 horas; E-F - após 96 horas de cultura. * - comparação dos dados sem PMA em relação ao grupo controle; # - comparação dos dados com PMA em relação ao grupo controle; * - comparação entre os dados sem e com PMA, dentro dos grupos. Abreviações utilizadas nos grupos: CONT - controle; M6 - *Aconitum napellus* e associações; M - M-CSF.

A avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas demonstrou que houve uma diminuição significativa na liberação desse reativo pelas células tratadas com o M6, após 72 horas de cultura. Aqui também os resultados foram semelhantes após 15 e 30 minutos de incubação, sendo que o PMA apresentou uma ação significativa apenas após 30 minutos. Aparentemente as células medulares precisam de mais tempo em contato com o PMA para que este seja efetivo quanto a liberação de H_2O_2 .



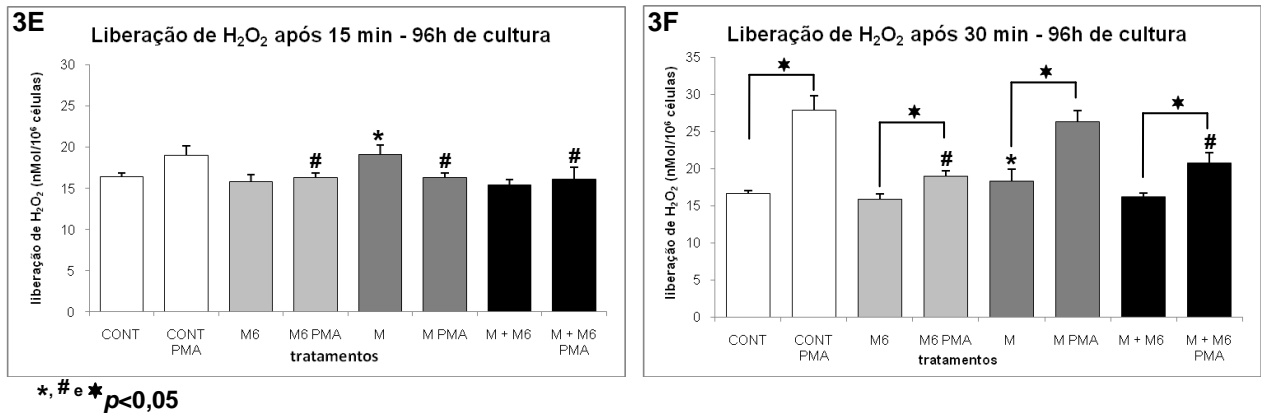


GRÁFICO 3 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Legenda: A-B - após 48 horas; C-D - após 72 horas; E-F - após 96 horas de cultura. * - comparação dos dados sem PMA em relação ao grupo controle; # - comparação dos dados com PMA em relação ao grupo controle; * - comparação entre os dados sem e com PMA, dentro dos grupos. Abreviações utilizadas nos grupos: CONT - controle; M6 - *Aconitum napellus* e associações; M - M-CSF.

Outra análise realizada foi quanto a liberação de NO pelas células medulares. O tratamento com o M6 reduziu significativamente a liberação desse reativo e o resultado foi semelhante nas células incubadas com LPS e IFN γ . Como o resultado foi o mesmo em todos os tempos de cultura analisados, apenas um gráfico será demonstrado.

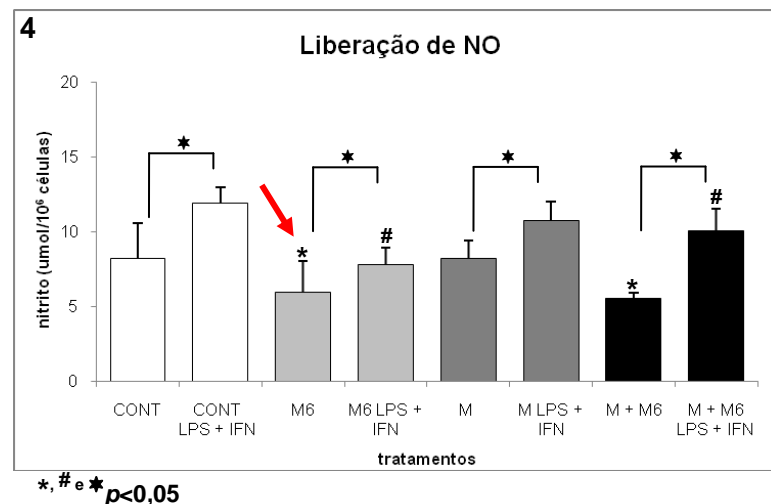


GRÁFICO 4 - GRÁFICO DEMONSTRANDO A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Legenda: * - comparação dos dados sem LPS e IFN γ em relação ao grupo controle; # - comparação dos dados com LPS e IFN γ em relação ao grupo controle; * - comparação entre os dados sem e com LPS e IFN γ , dentro dos grupos. Abreviações utilizadas nos grupos: CONT - controle; M6 - *Aconitum napellus* e associações; M - M-CSF.

4.3 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS NITROSILADAS (NITROTIROSINAS) PRESENTES NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

A diminuição significativa da liberação do óxido nítrico nos levou a pensar na possibilidade de uma combinação desse radical com o ânion superóxido seguida da formação do peroxinitrito (ONOO^-). Para confirmar essa interação verificamos a presença de proteínas nitrosiladas (nitrotirosinas) nas células medulares. A presença de nitrotirosinas é um indício da formação desse radical.

A seguir a figura do *blot* que confirmou essa presença.

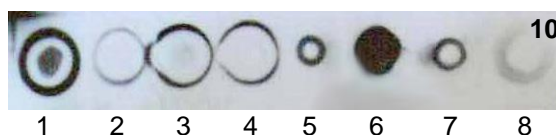


FIGURA 10 - PRESENÇA DE NITROTIROSINAS NAS PROTEÍNAS CELULARES

Os grupos testados foram: 1 - aderentes controles; 2 - aderentes tratadas com M6; 3 - aderentes controle positivo ($\text{LPS} + \text{IFN}\gamma$); 4 - aderentes tratadas com $\text{M6} + \text{LPS} + \text{IFN}\gamma$; 5 - sobrenadantes controles; 6 - sobrenadantes tratadas com M6; 7 - sobrenadantes controle positivo ($\text{LPS} + \text{IFN}\gamma$); 8 - sobrenadantes tratadas com $\text{M6} + \text{LPS} + \text{IFN}\gamma$.

Como pôde ser observado, apenas as células sobrenadantes tratadas com M6 apresentam proteínas nitrosiladas.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

Devido à importância desses fatores em todos os processos celulares, resolvemos analisar a presença de algumas citocinas no sobrenadante das culturas de medula óssea após tratamento com o M6. Verificamos que, de todas as citocinas analisadas (IL-2 , IL-4 , IL-5 , $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$), apenas a produção do $\text{TNF-}\alpha$ foi detectável nas culturas de células totais da medula óssea e o tratamento com o M6 não alterou essa liberação.

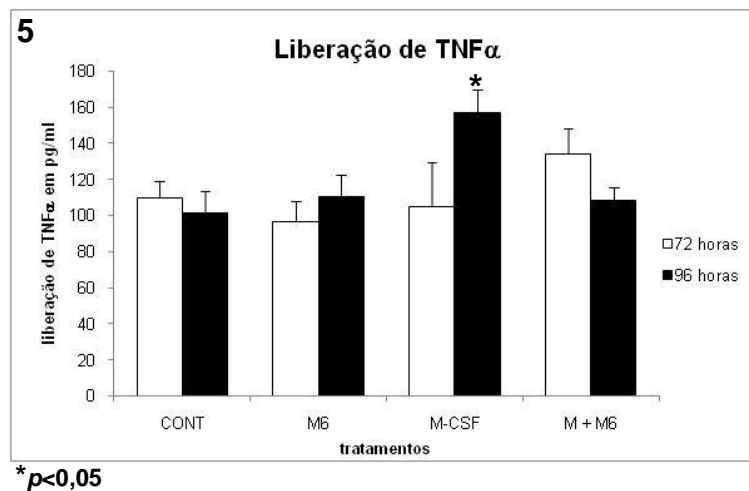


GRÁFICO 5 - LIBERAÇÃO DE $\text{TNF}\alpha$ APÓS 72 E 96 HORAS DE CULTURA

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações utilizadas nos grupos: CONT - controle; M6 - *Aconitum napellus* e associações; M - M-CSF.

4.5 IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem é uma ferramenta muito importante no estudo de células hematopoiéticas. Essa análise nos permite verificar, os grupos celulares presentes e também quantificá-los, com maior fidelidade.

4.5.1 Resultados após tratamento *in vitro*

Os tratamentos com M1 e M8 diminuíram significativamente a presença de alguns grupos celulares na população medular sobrenadante, sendo que outros grupos não apresentaram alteração.

TABELA 2 - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO SOBRENADANTE DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

MARCADORES	CONTROLE		M1		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
CD11b (Mac-1)	54,73	4,16	39,99*	8,05	50,94	1,96
CD11c	14,95	2,33	7,07*	0,40	6,76*	1,91
CD3ε	55,43	5,33	39,86**	2,09	27,98**	6,68
CD45R	62,42	2,04	47,51*	1,04	37,54**	5,78
Ly6G (Gr-1)	46,9	3,06	42,35	4,89	43,25	4,56
TER-119 (Ly-76)	19,99	1,72	20,62	2,70	19,07	0,14

**** $p < 0,01$; * $p < 0,05$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

As células CD11b⁺ diminuiriam significativamente no sobrenadante da cultura, após o tratamento com o M1, mas não houve alteração numérica após o tratamento com M8. As células CD11c⁺, CD3ε⁺ e CD45R⁺ apresentam-se reduzidas na população sobrenadante após os tratamentos com M1 e M8 e as células Ly6G⁺ e TER-119⁺ não apresentaram alteração numérica após os tratamentos.

4.5.2 Resultados após tratamento *in vivo* através da água de beber

TABELA 3a - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER

MARCADORES	CONTROLE		M1		M2		M6		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
CD11b (Mac-1)	73,08	0,31	74,52	1,97	76,48**	0,97	72,40	1,79	72,84	0,99
CD11c	5,36	0,64	27,42**	1,84	11,62**	1,21	8,49	1,10	7,44	0,26
CD3ε	5,30	0,59	16,05**	1,73	6,34	1,01	5,52	1,56	5,56	0,90
CD45R (B220)	21,35	2,71	28,86*	3,14	17,43*	0,83	26,78**	1,49	26,05*	1,37
Ly6G (Gr-1)	60,94	1,97	67,83*	3,77	71,48**	2,58	59,60	1,79	59,93	1,66
TER-119 (Ly-76)	6,6	0,17	4,82**	0,02	4,04*	0,31	6,74	1,48	8,15	0,83

**** $p<0,01$; * $p<0,05$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

TABELA 3b - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER

MARCADORES	CONTROLE		M4		M5	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
CD11b (Mac-1)	64,79	7,19	57,24	2,21	55,77	3,18
CD11c	13,08	1,81	14,02	5,68	15,43	6,96
CD3ϵ	13,20	2,95	21,73*	1,62	23,50	10,02
CD45R	46,51	5,04	41,35	5,21	42,92	2,65
Ly6G (Gr-1)	58,37	6,36	53,42	0,46	49,53*	2,86
TER-119 (Ly-76)	14,07	4,28	14,78	0,96	17,66	1,07

*** $p<0,05$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

Os tratamentos *in vivo* com M1, M2, M4, M5, M6 e M8 alteraram de maneira significativa o perfil quantitativo das células da medula óssea dos camundongos. Após o tratamento com o M1 houve um aumento significativo das células CD11c⁺, CD3 ϵ ⁺, CD45R⁺, Ly6G⁺ e uma diminuição das células TER-119⁺. O tratamento com M2 ocasionou um aumento significativo das células CD11b⁺, CD11c⁺ e Ly6G⁺ e uma diminuição das CD45R⁺ e TER-119⁺. O M4 aumentou significativamente as células CD3 ϵ ⁺ e o M5 diminuiu as células Ly6G⁺. Esse complexo apresentou uma tendência de aumento das células CD3 ϵ ⁺. M6 e M8 se comportaram de maneira semelhante, aumentando significativamente as células CD45R⁺.

4.6 VERIFICAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA REALIZADA PELAS CÉLULAS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER

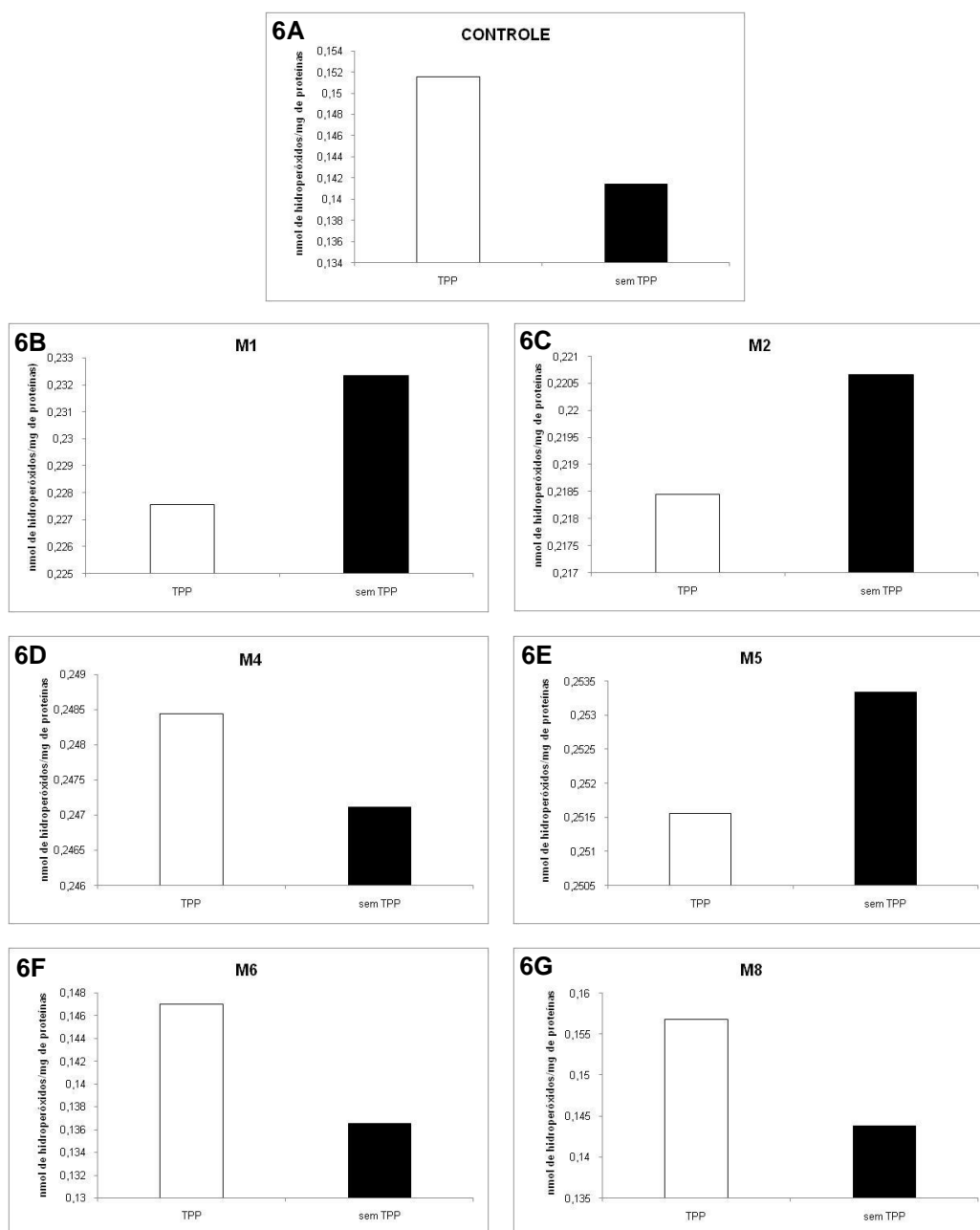


GRÁFICO 6 - PRESENÇA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER

A peroxidação lipídica ocorrida nas células conduz a formação de moléculas que apresentam capacidade de induzir a proliferação e diferenciação celular. Devido a essa ação, consideramos importante verificar a ocorrência desse processo. Observamos que os tratamentos com M1, M2 e M5 induzem essa oxidação.

4.7 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* POR VIA INALATÓRIA

TABELA 4 - IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO CELULAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* POR VIA INALATÓRIA

MARCADORES	CONTROLE		TUMOR (T)		T+M1		T+M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
CD11b (Mac-1)	62,03	0,12	73,28	0,82	67,37	4,92	70,55	1,59
CD11c	11,55	0,65	23,15	1,39	11,44**	0,88	16,27*	2,03
CD3ε	5,88	0,33	10,75	0,41	7,08*	1,33	6,79**	0,21
CD45R (B220)	25,49	0,88	31,25	6,67	28,43	2,46	39,42	4,99
Ly6G (Gr-1)	56,02	2,11	67,38	2,26	62,82	4,99	61,15	3,24
TER-119 (Ly-76)	17,62	0,41	11,06	2,13	12,75	0,31	11,25	0,60

**** $p < 0,01$; * $p < 0,05$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

Até o momento só havíamos analisado a ação desses complexos em animais saudáveis, portanto, resolvemos verificar seus efeitos na medula óssea de animais que apresentassem alguma patologia, no caso, que receberam células de melanoma (linhagem celular B16F10). Os animais que receberam as células tumorais e não foram tratados apresentaram um aumento de quase todas as populações celulares analisadas, com exceção da população eritrocítica. Os tratamentos com M1 e M8 reduziram o número das células CD11c⁺ e CD3ε⁺ praticamente retornando aos valores de normalidade (grupo controle). Já as células CD45R⁺, CD11b⁺ e Ly6G⁺ apresentaram uma tendência de diminuição após o tratamento com M1 e, as duas últimas, após o tratamento com M8.

As células TER-119⁺ estavam em menor número em todos os grupos analisados, quando comparadas ao controle.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CONEXINA 43 APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

TABELA 5 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CONEXINA 43 NAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

	CONTROLE		M1		M2		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
ADERENTES	6,47	0,17	2,97**	0,80	2,39**	0,82	2,94**	0,27
SOBRENADANTES	4,88	0,76	1,23**	0,39	1,57**	0,58	1,23**	0,19

**** $p < 0,01$; * $p < 0,05$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamentos. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

Devido a grande importância das conexinas, principalmente a conexina 43, no processo hematopoiético, consideramos essa análise pertinente. Nossos resultados mostraram que o tratamento *in vitro* com M1, M2 e M8 reduziu significativamente a expressão de Cx43, tanto na população aderente quanto sobrenadante da medula óssea.

4.9 CÉLULAS MEDULARES E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS PERMANECEREM EM CO-CULTURA

4.9.1 Medula óssea

4.9.1.1 Quantificação das células CD11b⁺

Analizamos os efeitos dos tratamentos com M1, M2 e M8 através de citometria de fluxo.

TABELA 6 - ANÁLISE DO MARCADOR CD11b APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

	CONTROLE		M1		M2		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
MO APÓS CO-CULTURA - SOBRENADANTES	58,85	4,26	-----		41,94**	5,08	55,24	5,77
MO APÓS CO-CULTURA - ADERENTES	97,25	1,76	97,65	0,64	97,84	0,09	97,23	0,23

**** $p < 0,01$**

Legenda: * - comparação entre controle e tratamento. Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

Após co-cultura com macrófagos peritoneais, observamos uma diminuição das células CD11b⁺, na população sobrenadante, após o tratamento com o M2.

Também verificamos que as células aderentes apresentaram-se, em sua maioria, como CD11b⁺ e não mostraram alteração, nesse parâmetro, após os tratamentos.

4.9.1.2 Análise da expressão do marcador CD11b

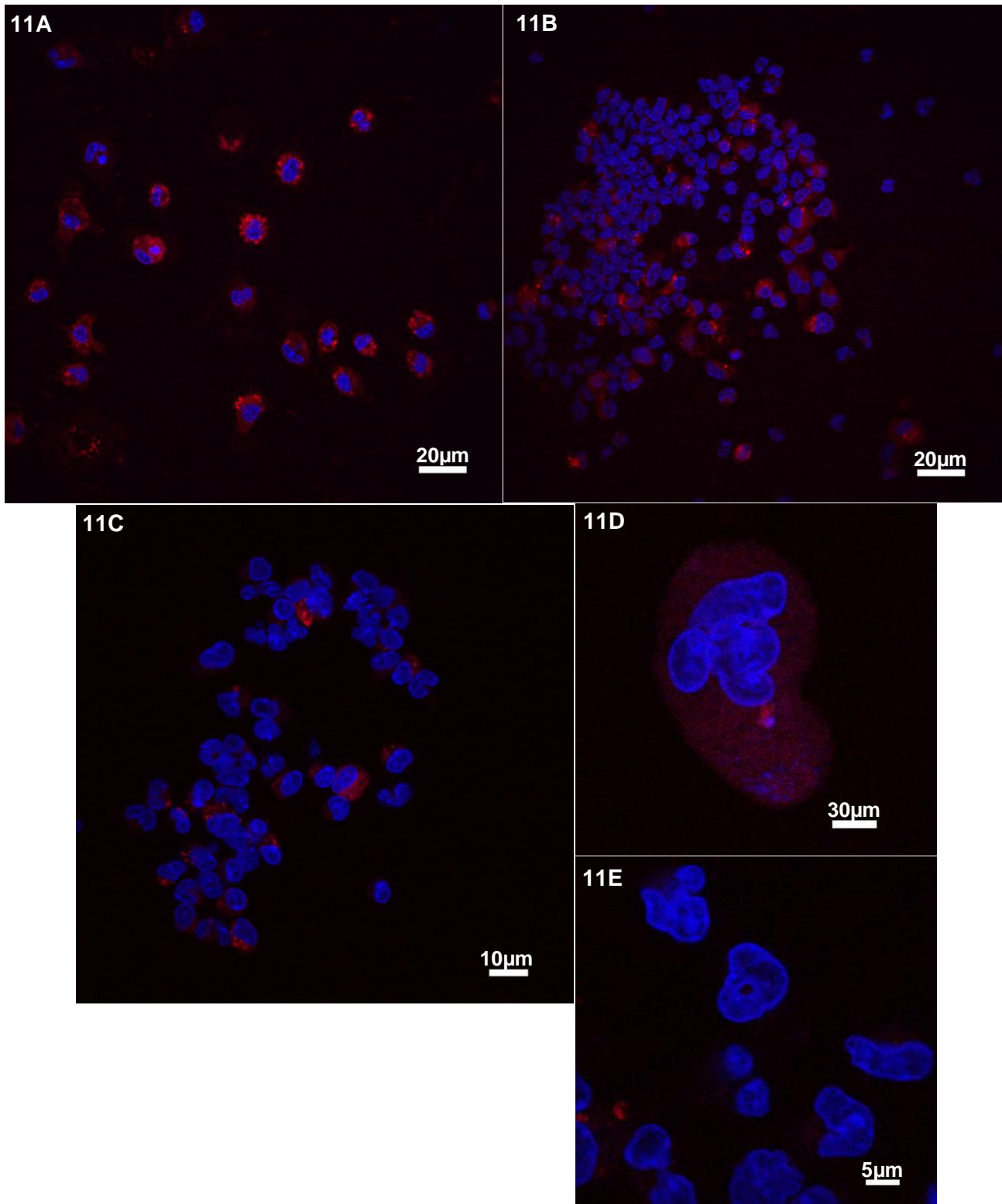


FIGURA 11 - MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA

Legenda: A - Medula óssea (MO) cultivada sozinha; B - MO após permanecer em co-cultura; C - ninho; D - megacariócito; E - célula progenitora (núcleo em anel). Objetivas utilizadas: A-B - 40x; C - 60x, D-E - 60x (imagens aumentadas para facilitar a visualização dos detalhes). A-B - barras equivalentes a 20µm; C - barra equivalente a 10µm; D - barra equivalente a 30µm; E - barra equivalente a 5µm.

Após a análise das células aderentes da medula óssea em microscopia confocal, verificamos que os tratamentos com M1, M2 e M8 não modificaram a expressão do marcador CD11b. A diferença encontrada foi entre as células cultivadas sozinhas e as que permaneceram em co-cultura, sendo que após a co-cultura, encontramos maior quantidade de células aderidas (FIGURA 11B). Na figura 11E demonstramos uma célula progenitora em detalhe (núcleo em anel).

4.9.2 Macrófagos peritoneais de camundongos

4.9.2.1 Análise morfológica

Após permanecerem em co-cultura, os macrófagos peritoneais de camundongos foram observados em microscopia eletrônica de varredura. Os tratamentos com M1, M2 e M8 alteraram a morfologia das células as quais se mostraram ativadas quando comparadas às células controle. Aparentemente não houve diferença entre os tratamentos utilizados (FIGURA 12).

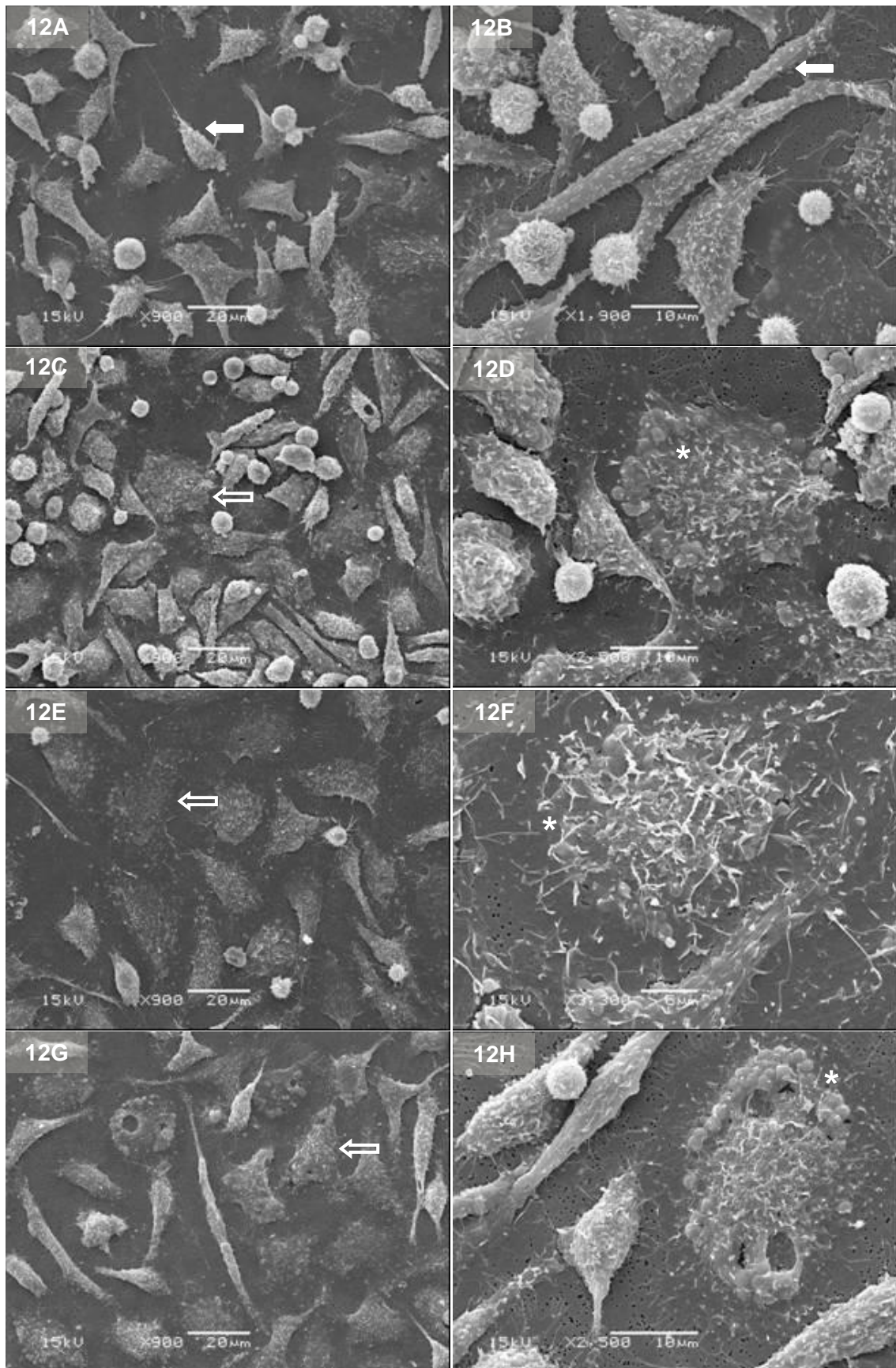


FIGURA 12 - MEV DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS APÓS CO-CULTURA COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

Legenda: A-B - grupo controle; C-D - grupo M1; E-F - grupo M2; G-H - grupo M8. Seta cheia - Mφs residentes; seta vazia - Mφs ativados; * - Mφs ativados em maiores aumentos. A, C, E e G - barras equivalentes a 20µm; B, D e H - barras equivalentes a 10µm; F - barra equivalente a 5µm.

4.10 ANÁLISE DA LINHAGEM ERITROBLÁSTICA LEUCÊMICA HUMANA K-562 *IN VITRO*

Após a análise dos efeitos dos complexos em camundongos com tumores de melanoma, resolvemos verificar esses efeitos em células humanas patológicas. O modelo escolhido foi a linhagem eritroblástica leucêmica K-562.

4.10.1 Verificação da viabilidade celular e apoptose

TABELA 7 - EFEITO DOS COMPLEXOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE DA LINHAGEM K-562 *IN VITRO*

	CONTROLE		M1		M2		M5		M6		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
viáveis	85,71	7,65	79,96	12,09	84,43	7,50	86,67	5,63	86,57	4,71	87,46	3,93
necrose	11,01	8,19	11,79	6,72	11,35	5,75	9,45	4,08	11,02	4,32	9,13	3,42
apoptose precoce	0,83	0,88	1,15	0,53	1,56	0,91	1,73	1,85	1,73	0,28	1,28	0,42
apoptose tardia	2,46	1,02	6,77	1,61	2,66	1,63	2,15	1,25	1,6	0,36	2,13	0,77

Legenda: Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

4.10.2 Verificação da proliferação celular

TABELA 8 - EFEITO DOS COMPLEXOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM K-562 *IN VITRO*

	CONTROLE		M1		M2		M5		M6		M8	
	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)	M (%)	DV (%)
G1	49,58	8,10	37,45	6,89	42,18	7,02	65,82	6,61	63,53	8,80	47,82	8,95
S	26,1	6,64	32,82	2,57	31,73	7,70	22,04	1,67	23,05	2,87	28,74	4,83
G2	21,20	2,61	26,28	4,07	22,86	9,11	10,27	4,42	11,49	5,45	20,14	8,72

Legenda: Abreviações: M (%) - média em porcentagem celular; DV (%) - desvio padrão em porcentagem celular.

Esses resultados nos mostraram que os tratamentos com M1, M2, M5, M6 e M8 não interferem na viabilidade celular e apoptose e também não alteram a taxa de proliferação celular. Esses dados confirmam a não toxicidade e mitogenicidade desses complexos.

5. DISCUSSÃO

A medula óssea apresenta uma vascularização especial e um microambiente altamente protegido, o que proporciona um habitat ideal para a manutenção das células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e seu desenvolvimento em células maduras. Após atingirem determinados estágios de desenvolvimento, essas células se encaminharão para os tecidos periféricos e exercerão suas respectivas funções. Durante a hematopoiese normal as HSCs se localizam em um microambiente especial, ou nicho, na medula óssea, o qual fornece fatores de crescimento, citocinas e moléculas necessárias por manter a sobrevivência, auto-renovação, proliferação e diferenciação celular (PAPAYANNOPOULOU; SCADDEN, 2008). Esse microambiente especial contém uma população heterogênea de células, incluindo células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, adipócitos e osteoblastos que, juntamente com moléculas de matriz extracelular, fornecem sustentação e também fatores necessários para a ocorrência da hematopoiese (WAGEY, 2008).

Estudos anteriores demonstraram que complexos altamente diluídos apresentam ação efetiva sobre a medula óssea de camundongos, ativando as células estromais e aumentando a diferenciação e proliferação das células hematopoiéticas *in vitro* e diferenciação *ex vivo* (ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2007; CESAR *et al.*, 2009). Esses resultados interessantes tornaram essencial a continuidade do estudo desses complexos em células medulares.

No presente estudo, verificamos o efeito de complexos altamente diluídos em células de medula óssea de camundongos após tratamento *in vitro*, após permanecerem em co-cultura com macrófagos peritoneais e também após tratamento *in vivo*. Também analisamos a ação desses compostos na linhagem eritoblástica leucêmica humana K-562 *in vitro*.

Resultados anteriores nos mostraram que o M6 modificou a morfologia das células estromais da medula óssea *in vitro*, resultando em um fenótipo de ativação (ABUD *et al.*, 2006). Para confirmar essa ativação realizamos experimentos para verificar atividade enzimática e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Primeiramente analisamos a atividade da fosfatase ácida total (AcPase) e da resistente ao tartarato (TRAP) *in vitro* e *ex vivo*.

Fosfatases ácidas (ortofosfórico-monoester fosfohidrolases) são enzimas encontradas em muitos tecidos de mamíferos, incluindo medula óssea e sangue periférico. Essas enzimas hidrolisam ésteres monofosfatos em ambientes ácidos, e a expressão indica ativação celular (DREXLER; GIGNAC, 1994).

Primeiramente discutiremos os resultados *in vitro*. A análise dos resultados da AcPase nos mostrou que tanto a população aderente quanto sobrenadante da medula óssea apresentaram maior atividade dessa enzima após tratamento com M6, indicando que as células medulares tratadas estão mais ativadas que as células controle. Essa enzima se liga a grupos fosfato de outras moléculas durante a digestão intracelular e encontra-se estocada nos compartimentos lisossômicos (SUTER *et al.*, 2001). A presença dessas enzimas digestivas capacita a célula a eliminar agentes patogênicos. A defesa não é a função principal dessas células, mas esse resultado nos confirma a ativação celular. A atividade da TRAP nas células aderentes é menor no grupo tratado com M6 quando se compara às células controle. A expressão da TRAP é encontrada em muitos tecidos sendo conhecida como marcadora de osteoclastos (MINKIN, 1982). Também está presente em macrófagos, evidenciando que osteoclastos são derivados de fagócitos mononucleares (SNIPES *et al.*, 1986). Histoquimicamente, osteoclastos expressam TRAP em grande quantidade enquanto macrófagos apresentam uma atividade mais baixa. O aumento dessa atividade em macrófagos caracteriza estados patogênicos como, leucemia *Hairy cells* e doença de Gaucher (HAYMAN *et al.* 2000). Outra célula hematopoiética que apresenta expressão de TRAP é a célula dendrítica (HAYMAN *et al.*, 2001). Resultados prévios nos mostraram que células dendríticas estão presentes na população aderente da medula óssea (ABUD *et al.*, 2006). Sabe-se que a TRAP se expressa em maior quantidade nas células dendríticas maduras que imaturas (HAYMAN *et al.*, 2001). Durante a diferenciação das células dendríticas, ocorre um aumento progressivo dos processos celulares, como aumento da expressão de moléculas MHCII, aparecimento de antígenos de superfície e intracelulares e uma progressiva diminuição da aderência ao plástico na cultura (INABA *et al.*, 1992). Isto justifica encontrarmos uma diminuição dessa expressão nas células aderentes e, conseqüentemente, aumento nas células sobrenadantes. O aumento da expressão dessa enzima nas células dendríticas maduras é importante devido a sua atividade de captura e processamento do antígeno e indica atividade da TRAP nesse processamento (HAYMAN *et al.*, 2001).

Outra célula não aderente, abundante na medula óssea é o neutrófilo (ZHANG *et al.*, 2005) e essas células expressam fosfatase ácida (KERPPOLA, 1951). O aumento da atividade da fosfatase ácida em células fagocíticas presentes no sobrenadante das culturas indica que essas células, após contato com o M6, se ativam, pois apresentam sua maquinaria de destruição de patógenos pronta para entrar em ação (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; GARIN *et al.*, 2001).

O resultado do experimento *ex vivo* foi semelhante ao demonstrado pelas células aderentes *in vitro*, ou seja, aumento da expressão da AcPase e diminuição da TRAP. Podemos dizer que o resultado que predomina visualmente, após o tratamento com o M6, é o das células aderentes, provavelmente devido à maior incidência dessas células quando se compara às não aderentes. É interessante ressaltar que esse resultado é o mesmo apresentado por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento *in vitro* com M6 (LOPES *et al.*, 2006).

A TRAP está envolvida com a produção de radicais livres (HAYMAN, 2000) estando presente nas principais células produtoras desses radicais como macrófagos ativados e neutrófilos (RÄISÄNEN *et al.*, 2005). A maioria das espécies reativas de oxigênio é produzida através da enzima NADPH oxidase e células TRAP⁺ mostram aumento dessa produção (BEDARD; KRAUSE, 2007; RÄISÄNEN *et al.*, 2005). A atividade da TRAP está aumentada nas células sobrenadantes, que são em sua maioria neutrófilos (ZHANG *et al.*, 2005) e como os neutrófilos produzem ROS e RNS em grande quantidade (LEE, 2003; PUNJABI *et al.*, 1992) resolvemos analisar a liberação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pelas células medulares, após tratamento *in vitro*.

Esses resultados mostraram uma variação na liberação de moléculas reativas, entre os grupos analisados. Dessa maneira, formamos o seguinte quadro.

TABELA 9 - RESUMO DOS RESULTADOS DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO PELAS CÉLULAS MEDULARES, APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

M6	
O_2^-	↑
H_2O_2	↓
NO	↓

Legenda: Setas indicando aumento ou diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células medulares.

Verificamos que a liberação do ânion superóxido aumentou e a do peróxido de hidrogênio e do óxido nítrico diminuíram após o tratamento com M6.

Leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, produzem e liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em resposta a fagocitose ou estimulação por diversos agentes (RÄISÄNEN *et al.* 2005). Além da resposta imunológica, espécies reativas também estão envolvidas nos processos de proliferação e diferenciação celular (PICCOLI *et al.*, 2005). Neutrófilos geram grande quantidade de ROS pelo processo conhecido como *burst* respiratório sendo que essa geração é quase que exclusivamente através da NADPH oxidase (NOX2) (BEDARD; KRAUSE, 2007). A NOX2 apresenta várias subunidades ligadas à membrana plasmática e também componentes solúveis, os quais se unem em um complexo na membrana quando a célula está ativada. A oxidase unida facilita a transferência de elétrons para o O_2 citoplasmático e o produto dessa reação é o ânion superóxido (O_2^-), que pode ser convertido a outros reativos de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa conversão pode ser espontânea ou acelerada pela superóxido dismutase (SOD). Outra reação que pode ocorrer é a oxidação do ânion cloreto (Cl^-) pelo H_2O_2 , reação catalizada pela enzima mieloperoxidase (MPO) e o produto formado é o ácido hipocloroso (HOCl). Juntos os ROS funcionam como agentes antimicrobianos altamente efetivos (LEE *et al.*, 2003).

Quando macrófagos e neutrófilos se apresentam em grande quantidade na cultura, ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, uma limitação na produção de células progenitoras (MEAGHER, 1988). Sugere-se então que oxidantes derivados de fagócitos causam danos a

progenitores hematopoiéticos e células estromais por alterarem moléculas de matriz extracelular ou inativarem fatores de crescimento (alterações estruturais nas proteínas). Para comprovar essa toxicidade suplementaram-se culturas com catalase (enzima responsável pela decomposição do H_2O_2) e, dessa maneira, ocorreu um aumento significativo na formação de células progenitoras (MEAGHER, 1988). Os subprodutos da NOX2 são responsáveis por danos celulares, mas também atuam como mediadores ou segundos mensageiros na regulação do ciclo celular, transdução de sinal e nos processos de diferenciação (PICCOLI *et al.*, 2005). A ação desses reativos é verificada na diferenciação induzida por RAF-1 em células de carcinoma. O aumento da concentração de H_2O_2 ativa essa proteína que desencadeia uma cascata de fosforilações, resultando na ativação de diversas subunidades protéicas, responsáveis pelo controle da expressão gênica envolvida nos processos de divisão celular, apoptose, diferenciação e migração celular. Esses reativos agem nessa via ativando fatores de transcrição nuclear (HA *et al.*, 2000). Devido ao modelo de ação apresentado, é provável que essa modulação ocorra também em outros tipos celulares. Citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos na geração de ROS através da estimulação celular. Interleucina-3 (IL-3) e eritropoetina (EPO) atuam sobre células hematopoiéticas e conseqüentemente ocorre um aumento da formação de ROS nessas células, os quais agem como intermediários da ação das citocinas sobre a proteína JAK2 desencadeando a ativação de uma cascata de reação, o que resultará na regulação da síntese protéica e, do metabolismo celular (IIYAMA *et al.*, 2006). Resumidamente podemos dizer que os ROS gerados pelas células desempenham um importante papel na ativação e propagação de sinais intracelulares levando a progressão do ciclo celular em células hematopoiéticas.

Esses reativos estão envolvidos na diferenciação dos osteoclastos pois, a depleção da atividade da NADPH oxidase bloqueia a diferenciação dessas células (LEE *et al.*, 2005). Também interferem na ativação de linfócitos B e esse processo provavelmente ocorre após a ativação do $NF\kappa B$ pelos ROS, que desencadeia a transcrição do BAFF (fator ativador de células B). Além de ativação, ocorre diminuição da taxa de apoptose (MOON *et al.*, 2006).

Além de produzir ROS, a NADPH oxidase pode agir como sensor dessa produção, sinalizando as células das mudanças ambientais e assim contribuindo

para o ajuste da concentração ideal, para que atuem como mensageiros (PICCOLI *et al.*, 2005). Essa função sensorial é muito importante, porque, em pequenas quantidades, esses reativos funcionam como mensageiros, mas em quantidades maiores atuam na fagocitose podendo ocasionar o estresse oxidativo (JANG; SHARKIS, 2007).

Nossos resultados nos mostraram um aumento da liberação do ânion superóxido e uma diminuição da liberação do peróxido de hidrogênio, após o tratamento com o M6. Esses dados podem ser explicados pelo consumo do H_2O_2 , resultando na formação do O_2^- , através da TRAP. Um dado interessante é que esses reativos apresentam maior efeito antibacteriano quando na presença dessa enzima a qual, sozinha, não apresenta essa atividade. Macrófagos com o gene da TRAP *knockout* mostram alteração na produção de radicais livres. Isso sugere que essa enzima está envolvida na geração de ROS e também na resposta imunológica (HAYMAN *et al.*, 2000; RÄISÄNEN *et al.*, 2005).

Reativos de oxigênio estão envolvidos nos processos de migração celular. O aumento da expressão de CXCR4 (receptor do SDF-1- *stromal cell-derived factor-1*) é uma importante estratégia para elevar a taxa de migração de células-tronco mesenquimais (MSCs) e os ROS estão envolvidos na regulação dessa expressão em vários tipos celulares, como células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais (LEE *et al.*, 2007). Um exemplo é a via de sinalização da ERK1/2 modulada por ROS a qual está envolvida na expressão do CXCR4 (LI *et al.*, 2009).

Os efeitos celulares dos ROS dependem da concentração e do tempo de exposição. Pouco tempo de exposição a uma baixa concentração de ROS resulta em uma ativação e aprimoramento das vias de sinalização que induzem a proliferação celular. Exposições prolongadas a baixas concentrações de ROS resultam em uma ativação prolongada dessas vias, comparando-se aos efeitos dos fatores de diferenciação. Exposições a altas concentrações podem ocasionar danos no DNA resultando em indução da ativação da proteína p53 e conseqüente expressão da p21, o que levará a uma parada na fase G1 do ciclo celular. Novas exposições podem ocasionar danos estruturais em proteínas e lipídios. Nessas condições podem ocorrer paradas no ciclo celular o que desencadeará processos

apoptóticos e, dependendo da gravidade dos danos ocorridos, as células entrarão diretamente em necrose (BOONSTRA; POST, 2004).

Raffaghello e colaboradores em 2008 demonstraram que células-tronco mesenquimais (MSCs) apresentam influência sobre a produção do H_2O_2 pelos neutrófilos, prevenindo o excesso ou a ativação inapropriada do metabolismo oxidativo dessas células, sem interferir na função fagocítica.

As espécies reativas estão em constante formação, dismutação e combinação intracelular e, esse balanço, é muito importante para a manutenção das condições celulares. Aparentemente o M6 contribui para essa manutenção, podendo agir sobre as células hematopoiéticas e/ou sobre as células estromais. Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que o M6 atua diretamente sobre a NOX2 de macrófagos peritoneais de camundongos (De OLIVEIRA *et al.*, 2006), o que nos sugere uma ação sobre essa enzima das células medulares.

A redução da liberação de óxido nítrico após o tratamento com M6 indica um consumo desse radical o qual se combinaria com o ânion superóxido resultando na formação do peroxinitrito ($ONOO^-$). Dessa maneira ocorreria menor produção do H_2O_2 e a célula estaria protegida dos seus efeitos deletérios (WINK *et al.*, 1995). Essa diminuição também pode indicar uma ação do complexo protegendo a célula dos efeitos diretos do NO.

O óxido nítrico se comporta como um regulador negativo da proliferação das células-tronco e conseqüentemente da hematopoiese. Um indício dessa ação é um aumento da proliferação e sobrevivência das HSCs após a supressão da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MICHURINA *et al.*, 2004). As isoformas da NOS são encontradas em células da medula óssea e sangue periférico de humanos e roedores. A iNOS (induzível) se expressa em megacariócitos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos, a eNOS (endotelial) em plaquetas, megacariócitos, linfócitos e a nNOS (neuronal) em neutrófilos (MICHURINA *et al.*, 2004; AICHER *et al.*, 2003; MACIEJEWSKI *et al.*, 1995). Mesmo atuando como um regulador negativo da hematopoiese, o NO apresenta capacidade de proteger as células dos efeitos dos ROS, através da formação do peroxinitrito. As isoformas da NOS estão expressas no estroma da medula óssea e a expressão da nNOS está correlacionada com a habilidade dessas células em fornecer suporte às HSCs e progenitores *in vitro* (KRASNOV *et al.*, 2008), provavelmente através desses mecanismos de proteção.

Um dos mecanismos propostos para explicar a toxicidade do NO é a nitração de proteínas (MACIEJEWSKI *et al.*, 1995). Proteínas nitradas aparecem em eosinófilos, neutrófilos e eritrócitos e geralmente não são observadas em mastócitos e macrófagos (HEIJNEN *et al.*, 2006). Isso pôde ser visualizado em nossos resultados, pois apenas as células sobrenadantes tratadas com o M6 mostraram a presença de nitrotirosinas. Provavelmente, o M6 protege as células e, por consequência, a medula óssea como um todo de potenciais danos oxidativos, através da formação do ONOO^- . Não podemos descartar a hipótese de danos ocasionados por esse produto, mas o importante para o microambiente é que nenhum desses reativos se apresente em grandes concentrações, ou seja, é esse equilíbrio que impede a ocorrência de danos mais efetivos causados pelas espécies reativas.

A nitração de proteínas em regiões críticas como, sítios de ligação enzima-substrato e receptor-ligante, interfere nas funções protéicas, devido à presença do grupo nitro (NO_2^-). A ligação do grupo NO_2^- a tirosinas compete com grupos fosfato (PO_4^{3-}), impedindo fosforilações necessárias ao desempenho das funções celulares (ZHAN; DESIDERIO, 2007). A presença de proteínas nitradas pode prejudicar as células, mas, resultados anteriores indicam que isso não ocorre em cultura, pois após 96 horas, as populações celulares da medula óssea se mantém (ABUD *et al.*, 2006), incluindo células que apresentam nitroproteínas, como neutrófilos e eritrócitos. Portanto, a formação do ONOO^- pode ser considerada um mecanismo de proteção dessas células.

Nossos resultados nos indicam que o M6 atua na modulação da liberação do NO, O_2^- e H_2O_2 , bem como na regulação da concentração dessas moléculas, as quais estão diretamente correlacionadas com a hematopoiese e, são essenciais para o desenvolvimento adequado desse processo.

Citocinas e fatores de crescimento são glicoproteínas que, em pequenas concentrações, agem sobre moléculas receptoras regulando a sobrevivência, morte, proliferação e diferenciação celular (QUESENBERRY; COLVIN, 2001). Devido à importância desses fatores em todos os processos celulares, resolvemos analisar a presença de algumas citocinas no sobrenadante das culturas de medula óssea após tratamento com o M6. Após essa análise verificamos que apenas o $\text{TNF}\alpha$ é

detectado acima dos níveis basais e o tratamento não alterou essa produção. Essa citocina está presente na medula óssea (MACIEJEWSKI *et al.*, 1995) e é importante para a regulação da hematopoiese agindo sobre populações celulares específicas desse microambiente. Apresenta uma ação pleiotrópica, dependendo da célula alvo e do estágio de diferenciação dessa célula (WANG *et al.*, 2003). Demonstra também uma ação sinérgica com outras citocinas, por exemplo, juntamente com IL-1 estimula a migração de linfócitos e aumenta a produção de granulócitos (UEDA *et al.*, 2005) e juntamente com o GM-CSF age na geração de células dendríticas na medula óssea, provavelmente estimulando a expressão de receptores de GM-CSF nos precursores dessas células (WANG *et al.*, 2003). Dessa maneira mostramos a importância da presença do $\text{TNF}\alpha$ no desenvolvimento da cultura de medula óssea.

A figura a seguir resume os resultados apresentados e permite uma melhor visualização das possíveis vias de formação utilizadas pelas moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio.

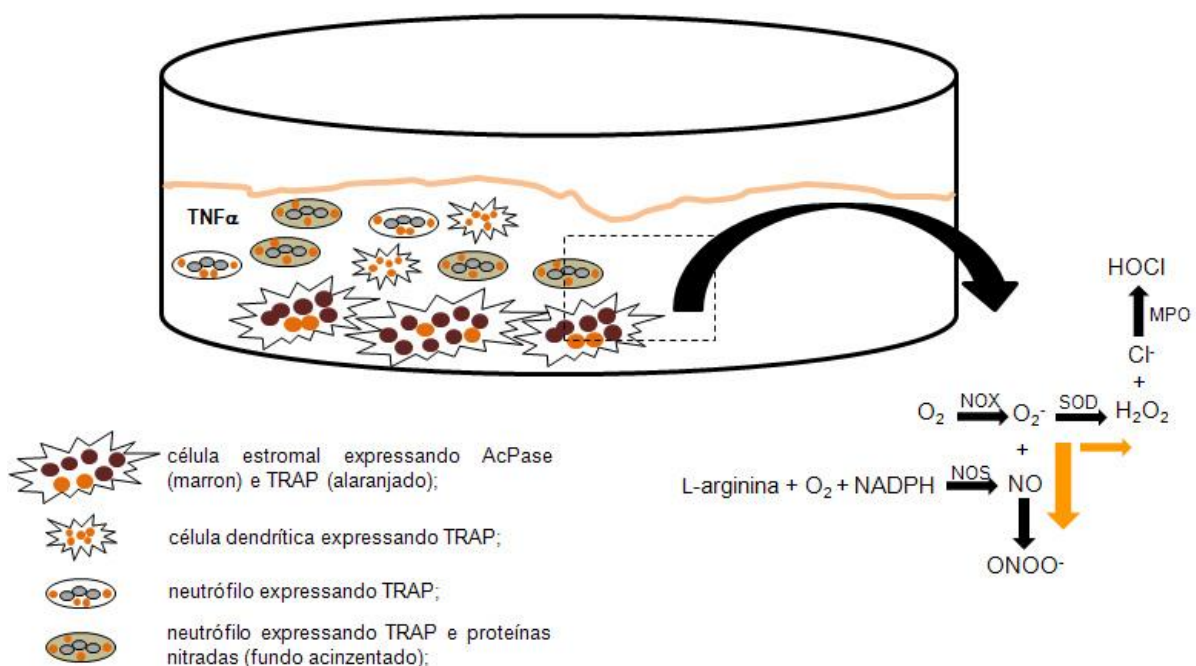


FIGURA 13 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO COM M6

Legenda: Células aderentes (estromais) e sobrenadantes (hematopoiéticas) expressando fosfatase ácida total (AcPase) e resistente ao tartarato (TRAP). Formação e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) pelas células medulares. Aparentemente as células tratadas com M6 apresentam um desvio na via de formação de espécies reativas, demonstrando uma maior concentração de peroxinitrito (ONOO^-). Presença de células nitradas no sobrenadante da cultura.

Após tratamento *in vitro* com o M1 e M8 verificamos uma diminuição das populações celulares sobrenadantes nas culturas de medula óssea. Com o M1, as células CD11b⁺, CD11c⁺, CD3ε⁺ e CD45R⁺ apresentaram uma redução numérica, sendo que as três últimas populações se mostraram reduzidas após o tratamento com M8. As células Ly6G⁺ e TER-119⁺ não se alteraram com nenhum dos tratamentos. As células CD11b⁺ (monócitos/macrófagos) e CD11c⁺ (células dendríticas) estão presentes no estroma medular, como já demonstrado em resultados anteriores (ABUD *et al.*, 2006). Esses complexos aparentemente facilitam a adesão dessas células auxiliando na formação do estroma medular. Resultados prévios nos mostraram que o M6 tem a capacidade de alterar a expressão de integrinas de membrana em macrófagos peritoneais de camundongos, estimulando a adesão celular (PIEMONTE; BUCHI, 2002). Possivelmente o M1 e o M8 apresentam efeitos semelhantes ou essa adesão pode ser em função de proliferação e/ou diferenciação celular. Sabe-se que as células precursoras hematopoiéticas precisam estar em contato com o estroma medular para que esses processos sejam ativados (FUCHS *et al.*, 2004). A diminuição das células CD3ε⁺ e CD45R⁺ também pode ser devido à proliferação e/ou diferenciação celular, pois as células estromais da medula óssea têm a capacidade de fornecer suporte para a diferenciação de precursores linfóides em células T (GARCIA-OJEDA *et al.*, 1998) e em células B maduras (KING *et al.*, 1989).

As células Ly6G⁺ e TER-119⁺ não apresentaram alteração numérica após os tratamentos. Estas células também precisam aderir para proliferar e diferenciar. Pode ser que o M1 e o M8 não interfiram nesses processos dessas células *in vitro*. Outra possibilidade é que essas células tenham aderido e já atingido um estágio de diferenciação no qual são capazes de se desligar do estroma medular, pois quanto mais diferenciada a célula está, menor sua capacidade de adesão (HURTADO *et al.*, 2004).

Resultados anteriores nos mostraram que o tratamento com o M6 induziu a formação de ninhos celulares, aglomerados de células hematopoiéticas sobre as estromais. Esses *clusters* celulares correspondem a prováveis locais de proliferação e/ou diferenciação (ABUD *et al.*, 2006). É interessante citar que culturas celulares tratadas com o M1 e M8 não só apresentam esses ninhos, mas ninhos maiores e em maior número, quando se compara ao grupo controle (dados da iniciação científica),

justificando o menor número de alguns tipos celulares no sobrenadante da cultura, após os tratamentos.

Outra análise realizada após os tratamentos *in vitro* foi a imunomarcagem da molécula conexina 43 (Cx43) nas células aderentes e sobrenadantes da medula óssea. Junções comunicantes ou *gaps junctions* são canais intercelulares formados por unidades individuais denominadas conexinas (Cx), as quais permitem o intercâmbio de uma variedade de pequenas moléculas citoplasmáticas. Estão presentes entre as células estromais e as hematopoiéticas. Várias isoformas de conexina são expressas nos tecidos hematopoiéticos, mas a Cx43 é a mais abundante (HARRIS, 2007; SAEZ *et al.*, 2003). Essa molécula apresenta grande importância, pois a deleção de Cx43 pode resultar em anormalidades hematopoiéticas *in vivo* e *in vitro*. As junções comunicantes das células estromais da medula óssea são compostas, praticamente apenas, por Cx43, sendo essa molécula a maior responsável pela comunicação entre essas células. Essa prevalência pode ser devido a grande permeabilidade que a Cx43 confere a membrana plasmática (CANCELAS *et al.*, 2000).

Progenitores hematopoiéticos estão ligados às células estromais através de Cx43 e essa ligação é responsável pelo controle da proliferação das HSCs (PARAGUASSÚ-BRAGA *et al.*, 2003). A expressão de conexinas é maior ou menor, dependendo do estágio de comprometimento e diferenciação celular e, quanto mais ligada a célula estiver ao estroma, menor o seu grau de comprometimento pois, *in vitro*, precursores mielóides e linfóides aderem firmemente ao estroma e migram sobre ele, formando ilhas de diferenciação enquanto células maduras são encontradas na fração celular sobrenadante (HURTADO *et al.*, 2004). A expressão de Cx43 é mais crítica nas células não-hematopoiéticas (estromais), devido à capacidade de suportar a hematopoiese que essas células apresentam. Com relação as células hematopoiéticas, estão mais presentes nas precursoras mielóides que nas linfóides (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2003).

O aumento na expressão de Cx43 resulta em um retardo na diferenciação das células sanguíneas, e no aumento da produção de precursores hematopoiéticos, enquanto a diminuição na expressão dessa molécula resulta em uma diferenciação acelerada dos precursores mielóides. Portanto, sugere-se que o acoplamento mediado por conexina nas células do estroma, module a razão entre proliferação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos. Logo, o aumento da comunicação

mediada por junções comunicantes no estroma, permite uma produção aumentada de células imaturas na medula óssea, através de um atraso em sua diferenciação terminal, induzindo conseqüentemente um período de proliferação prolongado dos precursores hematopoiéticos (BODI *et al.*, 2004). Essa capacidade é importante quando o tecido está se estabelecendo ou uma regeneração tecidual é necessária. A expressão de Cx43 é maior em camundongos neonatos que em adultos, o que indica que a presença dessa molécula é mais necessária em organismos em formação (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2003).

A expressão de Cx43 é pequena na medula óssea adulta (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2003) e essa informação corrobora os nossos resultados. Verificamos uma pequena expressão dessa molécula, tanto na população aderente quanto sobrenadante da medula óssea. Nossos resultados também nos mostram que, após o tratamento com o M1, M2 e M8 ocorre uma diminuição da expressão de Cx43, nas duas populações analisadas. Como a Cx43 está mais presente em células progenitoras e a diminuição dessa expressão resulta em uma diferenciação acelerada dos precursores, reforçamos a hipótese acima sugerida de que esses complexos estão envolvidos no processo de diferenciação celular, pois reduzem a expressão dessa molécula.

Após o tratamento *in vivo* com M1, na água de beber, verificamos uma permanência numérica das células CD11b⁺, um aumento das células CD11c⁺, CD3ε⁺, CD45R⁺ e Ly6G⁺ e uma diminuição das células TER-119⁺ na população medular total.

As células CD11b⁺ se apresentam em grande quantidade na medula óssea, estando no estroma medular e nas células hematopoiéticas. As alterações numéricas apresentadas pelas células CD11c⁺, CD3ε⁺ e CD45R⁺ provavelmente estão correlacionadas. Sabemos que células dendríticas, B e T circulantes podem migrar da periferia para a medula óssea. Esse *homing* depende da expressão de V-CAM-1 e selectinas nos microvasos medulares. Após essa migração, células dendríticas apresentam antígenos para as células T residentes (MAZO *et al.*, 2005). Dessa maneira, as células dendríticas podem realizar fagocitose na própria medula óssea ou podem capturar o antígeno no sangue periférico e migrar para esse microambiente. Na medula óssea essas células apresentam o antígeno para a célula T, as quais se estimulam e desencadeiam o processo de proliferação celular, portanto, a célula T ativada não apresentará apenas a função de sinalizar a

presença de agentes estranhos, mas também poderá enviar sinais que induzirão o comprometimento celular (FAURE *et al.*, 2004; CAVANAGH *et al.*, 2005). O número de células dendríticas que retorna para a medula óssea é semelhante ao que retorna ao baço, mas a medula apresenta maior capacidade de retenção dessas células (CAVANAGH *et al.*, 2005). Com isso dizemos que o M1 estimula essa capacidade de retenção pela medula óssea, o que é uma explicação para o aumento numérico dessas células.

O *homing* de células T também estimula a proliferação e diferenciação de células dendríticas progenitoras na medula óssea, mas, essa estimulação é mais efetiva sobre células maduras (periferia) que sobre células progenitoras (medula óssea) (FAURE *et al.*, 2004). A medula óssea constitui um reservatório de células T para eventual recrutamento e apresenta capacidade de reconstituir essa população celular na ausência do timo. A diferenciação final da célula T ocorre no timo e órgãos linfóides secundários, mas, essa célula já se apresenta comprometida com essa linhagem na medula óssea, apresentando a molécula CD3 ϵ (KLEIN *et al.*, 2003; MAZO *et al.*, 2005). Podemos dizer que o M1 está facilitando o *homing* dessas células levando a ativação de células T e dendríticas.

Neutrófilos constituem um importante mecanismo de defesa contra infecções. Em condições normais, uma pequena fração dessas células está na circulação (2% em camundongos), sendo que grande parte encontra-se estocada na medula óssea. Em resposta a uma infecção, neutrófilos são recrutados para controlar a invasão de patógenos no sangue periférico, realizando fagocitose, produzindo agentes oxidativos e enzimas digestivas. Durante o processo de defesa imunológica, essas células são eliminadas e o G-CSF é responsável por induzir a granulopoiese e refazer o reservatório na medula óssea. Devido à vida curta desse tipo celular (12-24 horas) estão continuamente sendo recrutados (RAFFAGHELLO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2005; NAVARINI *et al.*, 2009).

As células TER-119⁺ reduziram em número após o tratamento. Este dado nos indica diferenciação celular, pois essas células podem estar em um estágio de diferenciação adequado para deixarem a medula óssea e se encaminharem para o sangue periférico. Resultados prévios de nosso laboratório nos mostraram que pacientes HIV⁺ tratados com o M6 apresentaram aumento de eritrócitos no sangue periférico (STROPARO, 2005). Essa é mais uma evidência da capacidade de ação desses complexos sobre a diferenciação celular. As HSCs precisam de contato para

proliferar e/ou diferenciar e na eritropoiese, as células eritróides estão organizadas em pequenas unidades anatômicas, denominadas ilhas eritroblásticas. Nesses locais, as células se diferenciam, sendo que os macrófagos são as células responsáveis pela organização dessas ilhas. Soni e colaboradores, em 2007, mostraram que a *erythroblast macrophage protein* (EMP) é responsável pela ligação da célula eritroblástica ao macrófago e, após a diferenciação, as células se dirigem para os sinusóides da medula óssea (YOKOYAMA *et al.*, 2003; SONI *et al.*, 2007). Existe também um fator regulador da diferenciação eritróide (EDR) que é liberado pelas células estromais (DÖRMER *et al.*, 2004). Com essas informações, juntamente com os nossos resultados, sugerimos que o complexo age sobre as células estromais, facilitando o arranjo das ilhas (ninhos) e estimulando a liberação de fatores solúveis.

O tratamento com o M2 resultou em um aumento das células CD11b⁺ na medula óssea. Monócitos são originados nesse microambiente e, após atingirem o sangue periférico, continuam a sua diferenciação. Assim, dão origem a uma variedade de macrófagos residentes nos diferentes tecidos do organismo e também a células especializadas, como células dendríticas e osteoclastos. Os macrófagos especializados recebem nomes característicos, como, célula de Langerhans (epiderme), célula de Kupffer (fígado), micróglia (sistema nervoso central) entre outras (GORDON; TAYLOR, 2005). Devido a importância e a demanda dessas células, tanto para o microambiente medular (BROUDY *et al.*, 1986; BLASI *et al.*, 1987) quanto para os tecidos periféricos, pode ser encontrado um aumento desse grupo na medula óssea. Também foi verificada uma redução das células CD45R⁺, linfócito B e precursores, na medula óssea. Devido a capacidade de produzir anticorpos, os linfócitos B estão envolvidos em casos de autoimunidade e a depleção dessas células é utilizada no tratamento de doenças autoimunes como, lúpus eritematoso e artrite reumatóide (EISENBERG; ALBERT, 2006). A depleção é realizada utilizando-se fatores que inibam a diferenciação terminal dessas células (LI *et al.*, 2008). A redução numérica das células precursoras de linfócito B, encontrada apenas com o M2, sugerindo uma imunidade adquirida reduzida, mas aumento da imunidade inata (CD11b⁺), é um forte indício da atividade imunomoduladora desse produto. É importante ressaltar que esse resultado sugere uma possível administração da imunidade sem resultar em uma imunodepressão.

O aumento das células $CD3\epsilon^+$ após o tratamento com M4, pode ser explicado pela estimulação do *homing* dessas células. Podemos também considerar a função de reservatório de células T, que a medula óssea apresenta. Dessa maneira dizemos que esse complexo estimula o *homing* dessas células e também auxilia na manutenção do reservatório, para eventual recrutamento celular.

A medula óssea constitui um reservatório de neutrófilos. Verificamos que após o tratamento com M5, houve uma redução numérica das células $Ly6G^+$ no microambiente medular. Essa redução pode ser devido apenas ao processo de modulação ou a um recrutamento para os tecidos periféricos. A baixa celular na medula óssea pode indicar uma situação patológica, mas em situações normais, essa baixa é provisória devido a grande capacidade desse microambiente de refazer esse tipo celular. Na presença de interleucina 23 (IL-23) ocorre maior mobilização dessas células para o baço (DIETLIN *et al.*, 2009) e células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas e macrófagos, são capazes de produzir essa citocina (GEROSA *et al.*, 2008). Como essas células estão presentes na medula óssea, podemos supor que o M5 estimula a liberação dessa citocina, facilitando a mobilização das células $Ly6G^+$ para os tecidos periféricos.

Após o tratamento *in vivo* com M8, percebemos um aumento numérico das células $CD45R^+$, quando se compara ao grupo controle. Esse aumento pode ser explicado pelo *homing* dessas células para a medula óssea. As células B maduras, presentes nesse microambiente, não representam um *pool* de células de memória adquirido durante o desenvolvimento do organismo, mas sim uma população dinâmica continuamente renovada pelo influxo de células B recém geradas nos centros germinais dos órgãos linfóides secundários (PARAMITHIOTIS; COOPER, 1997). O contato entre o estroma medular e as células B é muito importante para o desenvolvimento desse tipo celular. Esse contato estimula a célula estromal a produzir citocinas e também expressar moléculas de superfície, o que auxiliará no desenvolvimento das células B. A ligação ocorre via VLA-4 da célula B e VCAM-1 da estromal (JARVIS *et al.*, 1997). Portanto, esse retorno, além de manter uma população de células B maduras na medula óssea, também é importante para uma eventual diferenciação terminal dessas células, as quais podem se diferenciar até plasmócitos, nesse microambiente (PARAMITHIOTIS; COOPER, 1997). Com isso, sugerimos que o M8 está facilitando esse processo, da mesma maneira que o M1 e

o M6. Outra explicação seria o recrutamento de células B para suprir as necessidades dos tecidos periféricos.

As células tratadas com M1, M2 e M5 realizaram peroxidação lipídica. Produtos dessa peroxidação, principalmente o 4-HNE, são capazes de afetar mecanismos celulares, em um processo concentração dependente. Enquanto baixos níveis de 4-HNE promovem proliferação celular, altas concentrações podem induzir diferenciação e/ou apoptose, dependendo do tempo de contato com a molécula (YANG *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2010). A formação do 4-HNE é proporcional a produção de ROS e aparentemente, a sinalização induzida pelos ROS regula as enzimas envolvidas na formação e metabolismo do 4-HNE. Dessa maneira, relacionamos os efeitos causados pela formação do 4-HNE e do H₂O₂. Ambos causam, em baixas concentrações, proliferação e, em altas concentrações, apoptose, são pequenas moléculas reativas, que apresentam tempo de meia-vida apropriado para muitos processos biológicos. Essas duas moléculas apresentam diferentes proteínas-alvo, o que resultará em modificações funcionais. Ainda não se sabe exatamente o mecanismo de ação do 4-HNE, mas sabe-se que essa molécula apresenta uma grande influência em processos celulares fundamentais incluindo, proliferação, diferenciação, eventos no ciclo celular e apoptose, em parte pela influência que apresenta sobre a expressão de numerosos genes (AWASTHI *et al.*, 2008). Portanto, a ocorrência de peroxidação lipídica é mais um dado que reforça a capacidade de ação desses complexos sobre a proliferação e/ou diferenciação celular na medula óssea.

Também avaliamos a ação do M1 e do M8 na medula óssea de animais C57BL/6 que receberam células de melanoma (linhagem celular B16F10). Até então só havíamos analisado a ação de complexos altamente diluídos em animais saudáveis, dessa maneira consideramos importante verificar essa ação em animais portadores de tumor. Os animais que receberam as células tumorais e não foram tratados apresentaram um aumento de quase todas as populações celulares analisadas, com exceção da população eritrocítica. O tratamento *in vivo*, por inalação, com esses complexos resultou em uma redução quantitativa das células CD11c⁺ e CD3ε⁺, as quais praticamente retornaram aos valores de normalidade (grupo controle). Já as células CD45R⁺, CD11b⁺ e Ly6G⁺ apresentaram uma tendência de diminuição e retorno à normalidade após o tratamento com M1 e as duas últimas após o tratamento com M8 (TABELA 4).

A análise dos resultados nos mostrou que o aumento numérico das células CD11c⁺ e CD3ε⁺ no grupo Tumor foi muito maior, quando se compara ao aumento apresentado pelos outros grupos celulares. Provavelmente isso ocorre devido a tentativa das células dendríticas (DC) (adjuvantes naturais) em apresentar antígenos tumorais às células T, uma vez que as DCs são grandes ativadoras dessas células, as quais mediam respostas imunológicas contra antígenos tumorais (células T anti-tumorais). Dessa maneira as células dendríticas controlam o tipo de resposta imunológica produzida pelas células T auxiliares ou citotóxicas (BANCHEREAU *et al.*, 2001; MÜLLER-BERGHAUS *et al.*, 2006). Análises em pacientes que apresentavam melanoma mostraram que DCs são capazes de apresentar antígenos derivados de células de melanoma lisadas, para as células T. Nesse trabalho verificou-se a regressão tumoral (ESCOBAR *et al.*, 2005).

As explicações para esse aumento numérico das células CD11c⁺ e CD3ε⁺, apresentado no grupo Tumor, são o *homing* e o recrutamento para a medula óssea. Sabemos que essas células apresentam a capacidade de realizar *homing*, quando necessário (MAZO *et al.*, 2005). Outra informação interessante é que células T se apresentam em maior número na medula óssea de pacientes com melanoma em estágio avançado (MÜLLER-BERGHAUS *et al.*, 2006). Aparentemente, no melanoma pulmonar dos camundongos não tratados, essa interação celular não foi suficiente para deter o crescimento tumoral (FIGURA 14B).

Após o tratamento com M8 percebemos uma tendência de aumento das células CD45R⁺, quando se compara ao grupo Tumor. Sabemos que linfócitos B estão envolvidos nos processos de metástase experimental derivada de células B16F10 (STAQUICINI *et al.*, 2008). Aparentemente o complexo está auxiliando no suprimento das necessidades de recrutamento do tumor, em contrapartida, não houve aumento de metástase no pulmão desses animais, como mostra a figura 14D a seguir:

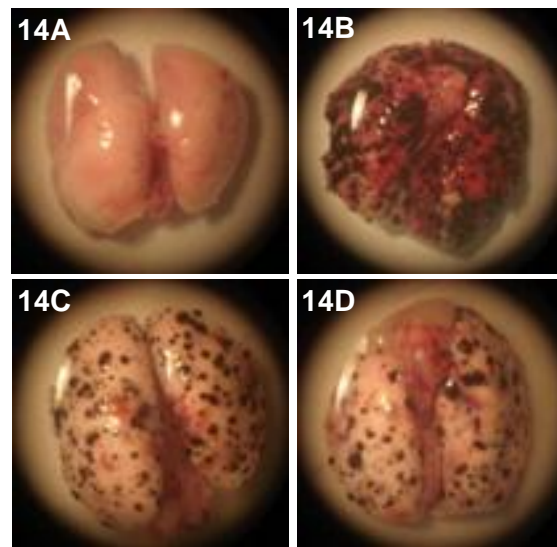


FIGURA 14 - IMAGENS DE PULMÃO APÓS A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Legenda: A - grupo controle; B - grupo tumor; C - grupo tumor + M1; D - grupo tumor + M8

FONTE: GUIMARÃES, 2009

Esse é mais um indício da atividade modulatória desses produtos, pois mesmo ocorrendo um aumento numérico das células B, houve redução das células CD11c⁺ e CD3ε⁺ e o organismo se encontra em processo de recuperação.

Essas imagens nos mostram que após os tratamentos, os animais se apresentavam em processo de recuperação, devido não só a redução do número de tumores, mas também do volume das massas tumorais. Isso explica o retorno às taxas normais das células medulares apresentado pelos grupos tratados com M1 e M8, indicando que esses complexos agem no organismo como um todo, auxiliando na sua recuperação. A recuperação desses animais foi visualizada e analisada em vários aspectos (GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Após todas essas análises realizadas em animais normais e portadores de melanoma, verificamos a influência do tratamento com M1, M2, M5, M6 e M8 em células humanas patológicas. O modelo escolhido foi a linhagem eritroblástica leucêmica K-562. Percebemos que os tratamentos não modificaram a viabilidade celular e apoptose e também não alteraram a taxa de proliferação celular. Esses dados confirmam a não toxicidade e mitogenicidade desses complexos. É interessante perceber que esses produtos estimulam as células normais e também agem sobre os animais com melanoma, mas não alteram as células leucêmicas isoladas em cultivo, nos parâmetros analisados.

Depois dessas análises realizamos um experimento de co-cultura das células medulares com macrófagos peritoneais de camundongos tratados com M1, M2 e M8. O primeiro ensaio realizado foi a quantificação das células CD11b⁺ por citometria de fluxo. Escolhemos analisar essas células devido ao papel central que monócitos e macrófagos desempenham na regulação hematopoiética (BROUDY *et al.*, 1986). A população aderente se mostrou quase que totalmente como CD11b⁺. Esse dado corrobora resultados anteriores, onde mostramos a grande maioria das células aderentes da medula óssea apresentando essa marcação (ABUD *et al.*, 2006). Os tratamentos não alteraram essa expressão. Com relação a população de células sobrenadantes da medula óssea, percebemos uma redução das células CD11b⁺, após o tratamento com M2, o que nos indica que esse complexo estimulou a adesão celular, contribuindo para formação do estroma medular e/ou facilitando a diferenciação dessas células. A microscopia confocal nos mostrou que os tratamentos não modificaram a expressão do marcador CD11b, nas células aderentes, após co-cultura. A diferença encontrada foi entre as células cultivadas sozinhas e as que permaneceram em co-cultura, onde encontramos maior quantidade de células aderidas (FIGURA 11B) as quais se apresentam em *clusters* (ninhos). Com isso, podemos dizer que os fatores solúveis, liberados pelos macrófagos peritoneais, influenciaram na formação desses ninhos. Os macrófagos apresentam grande importância no processo hematopoiético, pois além de fornecerem sustentação, liberam fatores de crescimento e estimulam outras células estromais a produzirem esses fatores (BROUDY *et al.*, 1986; BLASI *et al.*, 1987). No caso do experimento de co-cultura, não houve contato entre os macrófagos peritoneais e as células medulares, apenas troca de fatores solúveis, como M-CSF e GM-CSF. O M-CSF (CSF-1) regula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de monócitos/macrófagos e o GM-CSF (CSF-2) estimula a produção de granulócitos e macrófagos (CECCHINI *et al.*, 1994; METCALF *et al.*, 1986). A presença dos macrófagos no experimento de co-cultura permite uma maior concentração desses fatores importantes para a hematopoiese, sendo então razoável encontrar maior quantidade de células aderidas. A presença de células progenitoras aderidas (FIGURA 11E) é um indício da ocorrência de diferenciação. A microscopia eletrônica de varredura nos mostrou que, após os tratamentos, os macrófagos peritoneais se apresentam com morfologia de ativados. Verificamos maior presença de células aderidas e espalhadas, quando se compara ao grupo controle (FIGURA 12). Após a

análise dos dados obtidos com a microscopia confocal e a eletrônica de varredura, verificamos que, mesmo na ausência do tratamento, os macrófagos alteram o desenvolvimento da cultura de medula óssea, estimulando a formação de ninhos celulares.

As figuras a seguir resumem os resultados encontrados após os tratamentos *in vitro* e *in vivo* através da água de beber.

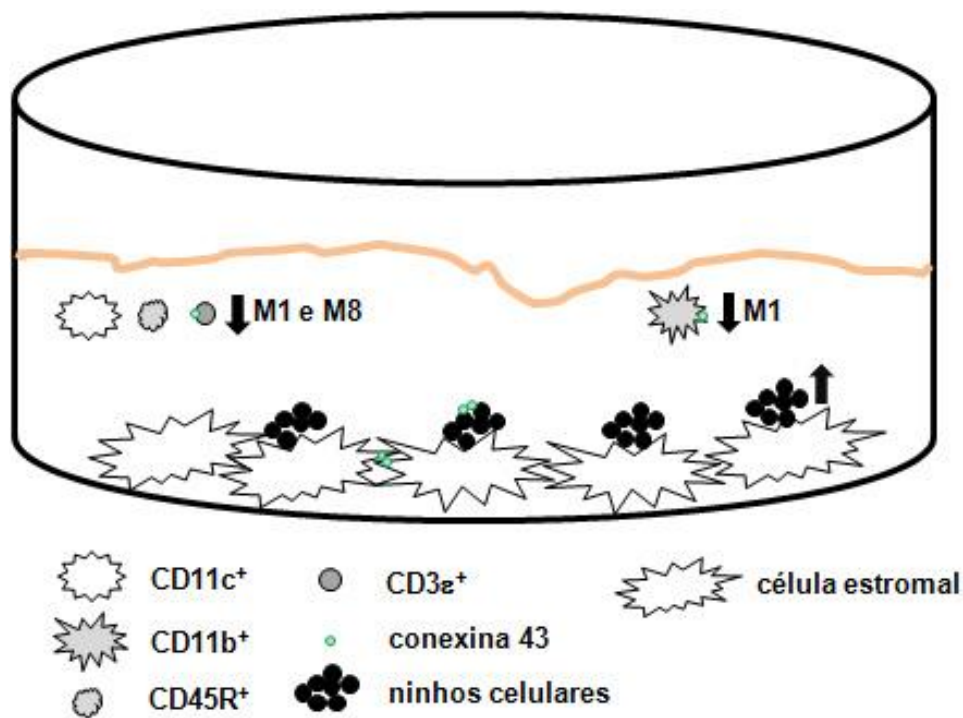


FIGURA 15 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO *IN VITRO* COM M1 E M8

Legenda: Células aderentes (estromais) e sobrenadantes (hematopoiéticas). Redução das células CD11b⁺, CD11c⁺, CD45R⁺ e CD3ε⁺ no sobrenadante das culturas. Adesão dessas células para provável proliferação/diferenciação. Maior número de ninhos celulares (dados da iniciação científica). Presença, mas redução da expressão de conexina 43 nas células medulares aderentes e sobrenadantes.

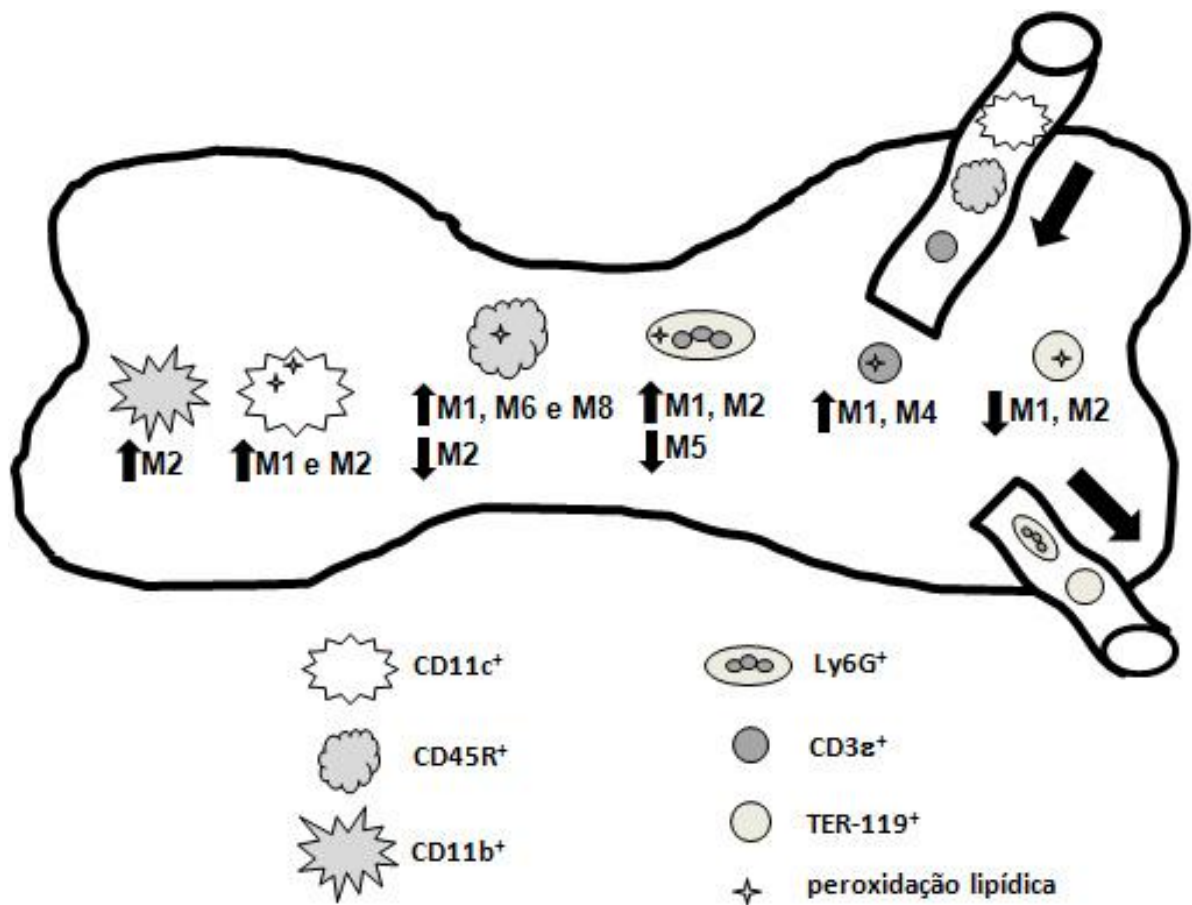


FIGURA 16 - RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS APÓS O TRATAMENTO *IN VIVO*, ATRAVÉS DA ÁGUA DE BEBER, COM M1, M2, M4, M5, M6 E M8

Legenda: Provável ocorrência de *homing* e recrutamento. Ocorrência de peroxidação lipídica nas células medulares, após tratamento com M1, M2 e M5.

Terapias focadas no estímulo e recrutamento de células-tronco hematopoiéticas tem sido foco de pesquisas relacionadas à resolução de diversas doenças. Todos os complexos estudados nesse trabalho mostraram atuar de alguma maneira sobre as células precursoras e estromais da medula óssea, uma das regiões mais ricas em células-tronco adultas. Esta é uma área importante para futuras pesquisas, pois à medida que esses conhecimentos se expandem, aumenta a esperança de possuímos a habilidade de influenciar seletivamente um estado de ativação celular específico, permitindo manipular uma terapia celular resolutive.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que os complexos altamente diluídos:

1. Ativam as células da medula óssea, pois alteram a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e modificam a atividade da fosfatase ácida total (AcPase) e da resistente ao tartarato (TRAP);
2. Ativam mecanismos de proteção celular, pois modulam a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e permitem a nitratação de proteínas;
3. Atuam na proliferação e/ou diferenciação, ativação, recrutamento, *homing* e manutenção do microambiente, modificando numericamente o perfil das populações medulares, reduzindo a expressão da molécula Cx43 e peroxidando lipídeos;
4. Modulam a resposta imunológica em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma B16F10, alterando o perfil das células da medula óssea para um nível mais próximo dos animais saudáveis;
5. Não apresentam citotoxicidade, pois a viabilidade celular, apoptose e taxa de proliferação das células leucêmicas da linhagem K-562 não foram alteradas.

Resumindo, essas alterações permitem concluir que os complexos atuam na medula óssea e no organismo como um todo, contribuindo para a manutenção e/ou recuperação de uma situação de equilíbrio, e que modulam o sistema, pois agem de maneira diferente em células normais e tumorais, também atuando diferentemente em animais sadios e portadores de melanoma, não apresentando toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A.P.R. **Ação *in vitro* do medicamento homeopático Canova em células de medula óssea de camundongos.** 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ABUD, A.P.R.; CÉSAR, B.; CAVAZZANI, L.F.M.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 30, n° 10, p. 808-816, 2006.

AICHER, A.; HEESCHEN, C.; MILDNER-RIHM, C.; URBICH, C.; IHLING, C.; TECHNAU-IHLING, K.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, v. 9, p. 1370 - 1376, 2003.

AWASTHI, Y.C.; SHARMA, R.; SHARMA, A.; YADAV, S.; SINGHAL, S.S.; CHAUDHARY, P.; AWASTHI, S. Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signaling for stress induced programmed cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n° 2, p. 111-118, 2008.

BABIOR, B.M. Oxidantes from phagocytes: agents of defense and destruction. **Blood**, v. 64, n° 5, p. 959-966, 1984.

BANCHEREAU, J.; SCHULER-THURNER, B.; PALUCKA, A.K.; SCHULER, G. Dendritic Cells as Vectors for Therapy. **Cell**, v. 106, p. 271-274, 2001.

BARREDA, D.R., HANINGTON, P.C., BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n° 5, p. 509-554, 2004.

BEDARD, K. and KRAUSE, K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 245–313, 2007.

BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE, V.; ORTOLANI, R. Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n° 4, p. 441–452, 2005.

BERTONCELLO, I and WILLIAMS, B. Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and Rhodamine 123 Staining. **Methods in Molecular Biology - Flow Cytometry Protocols**, Segunda Edição, Editora Humana Press, p. 181-200, 2004.

BIERMANN, H.; PIETZ, B.; DREIER, R.; SCHMID, K.W.; SORG, C.; SUNDERKÖTTER, C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, p. 217–231, 1999.

BLASI, E.; BACK, T.C.; STULL, S.W.; VARELIO, L. Regulation of Bone Marrow Cell Survival in Short-Term Cultures: A New Macrophage Function. **Cellular Immunology**, v. 104, p. 334-342, 1987.

BÔDI, E.; HURTADO, S.P.; CARVALHO, M.A.; BOROJEVIC, R.; DE CARVALHO, A.C.C. Gap junctions in hematopoietic stroma control proliferation and differentiation of blood cell precursors. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 76, n° 4, p. 743-756, 2004.

BOONSTRA, J and POST, J.A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, p. 1-13, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROM, J.; KOLLER, M.; SCHLUTER, B.; MULLER-LANGE, P.; ULRICH STEINAU, H.; KONING, W. Expression of the adhesion molecule CD11b and polymerization of actin by polymorphonuclear granulocytes of patients endangered by sepsis. **Burns**, v. 21, n°. 6, p. 427-431, 1995.

BROUDY, V.C.; ZUCHERMAN, K.S.; JETMALANI, S.; FITCHEN, J.H.; BAGBY Jr, G.C. Monocytes stimulate fibroblastoid bone marrow stromal cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. **Blood**, v. 68, n° 2, p. 530-534, 1986.

BRYDER, D.; ROSSI, D.J.; WEISSMAN, I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. **American Journal of Pathology**, v. 169, p. 338–346, 2006.

BUGARSKI, D.; KRSTIC, A.; MOJSILOVIC, S.; VLASKI, M.; PETAKOV, M.; JOVCIC, G.; STOJANOVIC, N.; MILENKOVIC, P. Signaling Pathways Implicated in

Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 156-163, 2007.

CANCELAS, J. A., KOEVOET, W. L. M., KONING, A. E., MAYEN, A. E. M., ROMBOUITS, E. J. C., PLOEMACHER, R. E. Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. **Blood**, v. 96, n° 2, p. 498-505, 2000.

CAVANAGH, L.L.; BONASIO, R.; MAZO, I.B.; HALIN, C.; CHENG, G.; VAN DER VELDEN, A.W.M.; CARIAPPA, A.; CHASE, C.; RUSSELL, P.; STARNBACH, M.N.; KONI, P.A.; PILLAI, S.; WENINGER, W.; VON ANDRIAN, U.H. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 6, n° 10, p. 1029–1037, 2005.

CECCHINI, M.G.; DOMINGUEZ, M.G.; MOCCI, S.; WETTERWALD, A.; FELIX, R.; FLEISCH, H.; CHISHOLM, O.; HOFSTETTER, W.; POLLARD, J.W.; STANLEY, E.R. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. **Development**, v. 120, p. 1357-1372, 1994.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron**, v. 39, n° 4, p. 461-470, 2007.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; Di BERNARDI, R.P.; GUIMARAES, F.S.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Treatment with at Homeopathic Complex Medication Modulates Mononuclear Bone Marrow Cell Differentiation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, <http://ecam.oxfordjournals.org> 2009.

CITTERIO, S.; RESCIGNO, M.; FOTI, M.; GRANUCCI, F.; AGGUJARO, D.; GASPERI, C.; MATYSZAK, M.K.; GIROLOMONI, G.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells as natural adjuvants. **Methods**, v.19, p. 142-147, 1999.

CIVIN, C.I., LOKEN, M.R. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. **International Journal of Cell Cloning**, v. 5, p. 267-288, 1987.

DE OLIVEIRA, C.C.; DE OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, p. 420-432, 2006.

DE OLIVEIRA, C.C.; DE OLIVEIRA, S.M.; GOES, V.M.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A.; BUCHI, D.F. Gene Expression Profiling of Macrophages Following Mice Treatment With an Immunomodulator. **Medication Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 1364-1377, 2008.

Di BERNARDI, R.P. **Recuperação de pacientes HIV/AIDS em Botswana, África, com uso do medicamento homeopático Canova**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DIETLIN, T.A.; CUA, D.J.; BURKE, K.A.; LUND, B.T.; VAN DER VEEN, R.C. Role of IL-23 in mobilization of immunoregulatory nitric oxide- or superoxide-producing Gr-1+ cells from bone marrow. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 357–363, 2009.

DÖRMER, P.; SPITZER, E.; MOLLER, W. EDR is a stress-related survival factor from stroma and other tissues acting on early haematopoietic progenitors (E-Mix). **Cytokine**, v. 27, p. 47-57, 2004.

DREXLER, H.G.; AND GIGNAC, S.M. Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in hematopoietic cells. **Leukemia**, v. 8, n° 3, p. 359-368, 1994.

ERNST. E. A systematic review of systematic reviews of homeopathy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 577–582, 2002.

ESCOBAR, A.; LÓPEZ, M.; SERRANO, A.; RAMIREZ, M.; PÉREZ, C.; AGUIRRE, A.; GONZÁLEZ, R.; ALFARO, J.; LARRONDO, M.; FODOR, M.; FERRADA, C.; SALAZAR-ONFRAY, F. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, p. 555–568, 2005.

EISENBERG, R. and ALBERT, D. B-cell targeted therapies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 2, p. 20-27, 2006.

FALZARANO, G.; KRENGER, W.; SNYDER, K.M.; DELMONTE JR, J.; KARANDIKAR, M.; FERRARA, J.L. Suppression of B-cell proliferation to lipopolysaccharide is mediated through induction of the nitric oxide pathway by tumor necrosis factor-alpha in mice with acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 87, n°. 7, p. 2853-2860, 1996.

FAURE, M.; VILLIERS, C.L.; PATRICE N. MARCHE, P.N. Normal differentiation and functions of mouse dendritic cells derived from RAG-deficient bone marrow progenitors. **Cellular Immunology**, v. 228, p. 8-14, 2004.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1317–1327, 2003.

FUCHS, E.; TUMBAR, T., GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem Cells and their niche. **Cell**, vol. 116. p. 769-778. 2004.

GARCIA-OJEDA, M.E.; DEJBAKHSJ-JONES, S.; WEISSMAN, I.L.; AND STROBER, S. An alternate pathway for T cell development supported by the bone marrow microenvironment: recapitulation of thymic maturation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 1813–1823, 1998.

GARIN, J.; DIEZ, R.; KIEFFER, S.; DERMINE, J.F.; DUCLOS, S.; GAGNON, E.; SADOUL, R.; RONDEAU, C.; DESJARDINS, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. **The Journal of Cell Biology**, v. 152, n° 1, p. 165-180, 2001.

GEROSA, F.; BALDANI-GUERRA, B.; LYAKH, L.A.; BATONI, G.; ESIN, S.; WINKLER-PICKETT, R.T.; CONSOLARO, M.R.; DE MARCHI, M.; GIACHINO, D.; ROBBIANO, A.; ASTEGIANO, M.; SAMBATARO, A.; KASTELEIN, R.A.; CARRA, G.; TRINCHIERI, G. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n° 6, p. 1447-1461, 2008.

GOODELL, M.A.; BROSE, K.; PARADIS, G.; CONNER, A.S.; MULLIGAN, R.C. Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 1797-1806, 1996.

GORDON, S. AND TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]-nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUILBERT, L.J.; STANLEY, E.R. Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 85, n° 1, p. 153-159, 1980.

GUIMARÃES, F.S.F. **Potencial anti-melanoma de complexos imunomodulatórios homeopáticos**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

GUIMARÃES, F.S.F.; ABUD, A.P.R.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; CESAR, B.; ANDRADE, L.F.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; BUCHI, D.F. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p. 293, 2009.

GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T.; ABUD, A.P.R.; SENE, R.V.; WANDERER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLLIN, M.; BUCHI, D.F.; TRINDADE, E.S. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcareo carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, p. 113, 2010.

GURKAN, U.A.; AKKUS, O. The Mechanical Environment of Bone Marrow: A Review. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n° 12, p. 1978–1991, 2008.

GUTCHER, I.; BECHER, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1119–1127, 2007.

HA, H.C.; THIAGALINGAM, A.; NELKIN, B.D.; CASERO JR, R.A. Reactive Oxygen Species Are Critical for the Growth and Differentiation of Medullary Thyroid Carcinoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3783–3787, 2000.

HAHNEMANN, S. **ORGANON da arte de curar**. Robe Editorial. 6ª edição. 248pg. 2001.

HARRIS, A.L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 94, n° 1-2, p. 120-143, 2007.

HAYMAN, A.R.; BUNE, A.J.; BRADLEY, J.R.; RASHBASS, J.; COX, T.M. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): Its localization to dendritic

cells and diverse murine tissues. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n°. 2, p. 219-227, 2000.

HAYMAN, A.R.; MACARY, P.; LEHNER, P.J.; COX, T.M. Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp-5): Identification in diverse human tissues and dendritic cells. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n°. 6, p. 675-683, 2001.

HEIJNEN, H.F.G.; DONSELAAR, E.V.; SLOT, J.W.; FRIES, D.M.; BLACHARD-FILLION, B.; HODARA, R.; LIGHTFOOT, R.; POLYDORO, M.; SPIELBERG, D.; THOMSON, L.; REGAN, E.A.; CRAPO, J.; ISCHIROPOULOS, H. Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 1903-1913, 2006.

HURTADO, S.P.; BALDUINO, A.; BÔDI, E.C.A.; EL-CHEIKH, M.C.; DE CARVALHO, A.C.C.; BOROJEVIC, R. Connexin expression and gap-junction-mediated cell interactions in an in vitro model of haemopoietic stroma. **Cell and Tissue Research**, v. 316, p. 65-76, 2004.

IGUCHI, A.; OKUYAMA, R.; KOGUMA, M.; OBINATA, M.; YANAI, N. Selective Stimulation of Granulopoiesis in vitro by Established Bone Marrow Stromal. **Cell Structure and Function**, v. 22, p. 357-364, 1997.

IYAMA, M.; KAKIHANA, K.; KUROSU, T.; MIURA, O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor mediated signaling and in cell cycle progression. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 174-182, 2006.

INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, p. 1693-1702, 1992.

JANG, Y-Y.; SHARKIS, S.J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood**, v. 110, n°. 8, p. 3056-63, 2007.

JARVIS, L.J.; MAGUIRE, J.E.; LEBIEN, T.W. Contact Between Human Bone Marrow Stromal Cells and B Lymphocytes Enhances Very Late Antigen-4/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 – Independent Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase, Paxillin, and ERK2 in Stromal Cells. **Blood**, v. 90, n°. 4, p. 1626-1635, 1997.

JIANG, H.; CHESS, L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1198-1208, 2004.

JONAS, W.B., JACOBS, J. A cura através da homeopatia. Editora Campus. 283 pg. Rio de Janeiro, 1996.

JONAS, W.; KAPTCHUK, T.J.; LINDE, K. A critical overview of homeopathy. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, p. 393-399, 2003.

JONGSMA, H.J.; WILDERS, R. Gap junctions in cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 86, n° 12, p. 1193-1197, 2000.

KAPLAN, R.N.; PSAILA, B.; LYDEN, D. Niche-to-niche migration of bone marrow-derived cells **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n°. 2, p. 72-81, 2007.

KERPPOLA, W. Observations on the phosphatase content of blood and bone marrow cells in normal and pathologic hemopoiesis. **Blood**, v. 6, n°. 5, p. 454-465, 1951.

KATSURA, Y. Redefinition of lymphoid progenitors. **Nature Reviews**, v. 2, p. 1-6, 2002.

KINA, T.; IKUTA, K.; TAKAYAMA, E.; WADA, K.; MAJUMDAR, A.S.; WEISSMAN, I.L.; KATSURA, Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. **British Journal of Haematology**, v. 109, p. 280-287, 2000.

KING, A.G.; LANDRETH, K.S.; WIERDA, D. Bone Marrow Stromal Cell Regulation of B-Lymphopoiesis. II. Mechanisms of Hydroquinone Inhibition of Pre-B Cell Maturation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 250, n°. 2, p. 582-590.

KLEIN, F.; FELDHAHN, N.; LEE, S.; WANG, H.; CIUFFI, F.; VON ELSTERMANN, M.; TORIBIO, M.L.; SAUER, H.; WARTENBERG, M.; BARATH, V.S.; KRÖNKE, M.; WERNET, P.; ROWLEY, J.D.; MÜSCHEN, M. T lymphoid differentiation in human bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n° 11, p. 6747–6752, 2003.

KONDO, M., WAGERS, A.J., MANZ, M.G., PROHASKA, S.S., SCHERER, D. C., BEILHACH, G.F., SHIZURU, J.A., WEISSMAN, I.L. Biology of hematopoietic stem

cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 759-806, 2003.

KRASNOV, P.; MICHURINA, T.; PACKER, M.A.; STASIV, Y.; NAKAYA, N.; MOORE, K.A.; DRAZAN, K.E.; ENIKOLOPOV, G. Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to the Regulation of Hematopoiesis. **Molecular Medicine**, v. 14, p. 141-149, 2008.

LAGASSE, E. and WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 197, p. 139-150, 1996.

LEBIEN, T.W.; AND TEDDER, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n°. 5, p. 1570-1580, 2008.

LEE, N.K.; CHOI, Y.G.; BAIK, J.Y.; HAN, S.Y.; JEONG, D-W.; BAE, Y.S.; KIM, N.; LEE, S.Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. **Blood**, v. 106, n°. 3, p. 852-859, 2005.

LEE, R.L.; WESTENDORF, J.; GOLD, M.R. Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 1, p. 33-43, 2007.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299-1306, 2003.

LI, S.; DENG, Y.; FENG, J.; YE, W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. **Cell Biology International**, v. 33, p. 411-418, 2009.

LI, Y.; CHEN, F.; PUTT, M.; KOO, Y.K.; MADAIO, M.; CAMBIER, J.C.; COHEN, P.L.; EISENBERG, R.A. B Cell Depletion with Anti-CD79 mAbs Ameliorates Autoimmune Disease in MRL/lpr Mice. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 2961-2972, 2008.

LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, p. 277-287, 2006.

MA, L.; SCHEERS, W.; VANDENBERGHE, P. A flow cytometric method for determination of absolute counts of myeloid precursor dendritic cells in peripheral blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, p. 215-221, 2004.

MACIEJEWSKI, J.P.; SELLEN, C.; SATO, T.; CHO, H.J.; KEEFER, L.K.; NATHAN, C.F.; YOUNG, N.S. Nitric Oxide Suppression of Human Hematopoiesis In Vitro Contribution to Inhibitory Action of Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 1085-1092, 1995.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.; GERSON, S.L. Phenotypic and Functional Comparison of Cultures of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Stromal Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, p. 57-66, 1998.

MAZO, I.B.; HONCZARENKO, M.; LEUNG, H.; CAVANAGH, L.L.; BONASIO, R.; WENINGER, W.; ENGELKE, K.; XIA, L.; MCEVER, R.P.; KONI, P.A.; SILBERSTEIN, L.E.; VON ANDRIAN, U.H. Bone Marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. **Immunity**, v. 22, p. 259-270, 2005.

MCCONVILLE, J.T.; WILLIAMS, R.O.; CARVALHO, T.C.; IBERG, A.N.; JOHNSTON, K.P.; TALBERT, R.L.; BURGESS, D.; PETERS, J.I. Design and evaluation of a restraint-free small animal inhalation dosing chamber. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 1, p. 35-42, 2005.

MEAGHER, R.C.; SALVADO, A.J.; WRIGHT, D.G. An analysis of the multilineage production of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: Evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self-renewal. **Blood**, v. 72, n° 1, p. 273-281, 1988.

MÉNDEZ-FERRER, S.; FRENETTE, P.S. Hematopoietic Stem Cell Trafficking Regulated Adhesion and Attraction to Bone Marrow Microenvironment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, p. 392-413, 2007.

METCALF, D. The Molecular Biology and Functions of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. **Blood**, v. 67, n° 2, p. 257-267, 1986.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, p. 485-491, 2008.

MICHURINA, T.; KRASNOV, P.; BALAZS, A.; NAKAYA, N.; VASILIEVA, T.; KUZIN, B.; KHRUSHCHOV, N.; MULLIGAN, R.C.; ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide is a

regulator of hematopoietic stem cell activity. **Molecular Therapy**, v. 10, p. 241–248, 2004.

MINKIN, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcified Tissue International**, v. 34, p. 285-290, 1982.

MONEYPENNY, C.G. and GALLAGHER, E.P. 4-Hydroxynonenal inhibits cell proliferation and alters differentiation pathways in human fetal liver hematopoietic stem cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 105–112, 2005.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E and DORSHKIND, K. Regulation of hematopoiesis by gap junction-mediated intercellular communication. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 341-347, 2001.

MOON, E-Y.; LEE, J-H.; OH, S-Y.; RYU, S-K.; KIM, H-M.; KWAK, H-S.; YOON, W-K. Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 2103–2111, 2006.

MOORE, R.N.; OPPENHEIM, J.J.; FARRAR, J.J.; CARTER, C.S.Jr.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. Production of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. **The Journal of Immunology**, v. 125, n°. 3, p. 1302-1305, 1980.

MOTOYOSHI, K. Biological activities and clinical applications of M-CSF. **International Journal of Hematology**, v. 67, n°. 2, p 109-122, 1998.

MOULIAN, N.; TRUFFAULT, F.; GAUDRY-TALARMAIN, Y.M.; SERRAF, A.; BERRIH-AKNIN, S. In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. **Blood**, v. 97, p. 3521-3530, 2001.

MÜLLER-BERGHAUS, J.; EHLERT, K.; UGUREL, S.; UMANSKY, V.; BUCUR, M.; SCHIRRMACHER, V.; BECKHOVE, P.; SCHADENDORF, D. Melanoma-Reactive T Cells in the Bone Marrow of Melanoma Patients: Association with Disease Stage and Disease Duration. **Cancer Research**, v. 66, n° 12, p. 5997-6001, 2006.

MÜLLER-SIEBURG, C. E., DERYUGINA, E. The stromal cells: guide to the stem cell universe. **Stem Cells**, vol. 13. p. 477-486, 1995.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.

NAVARINI, A.A.; LANG, K.S.; VERSCHOOR, A.; RECHER, M.; ZINKERNAGEL, A.S.; NIZET, V.; ODERMATT, B.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n° 17, p. 7107-7112, 2009.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p.403-409, 1994.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University. 1985. Disponível em: (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim). Acesso: 07/06/2010

PAPAYANNOPOULOU, T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. **Blood**, v. 103, p. 1580-1585, 2004.

PAPAYANNOPOULOU, T. and SCADDEN, D.T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, p. 3923-3930, 2008.

PARAGUASSÚ-BRAGA, F.H.; BOROJEVIC, R.; BOUZAS, L.F.; BARCINSKI, M.A.; BONOMO, A. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 1101-1108, 2003.

PARAMITHIOTIS, E. AND COOPER, M.D. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 94, p. 208–212, 1997.

PEARCE, D.J.; RIDLER, C.M.; SIMPSON, C.; BONNET, D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. **Blood**, v. 103, n° 7, p. 2141-2546, 2004.

PEREIRA, W.K.V.; LONARDONIB, M.V.C.; GRESPANA, R.; CAPARROZ-ASSEFA, S.M.; CUMANA, R.K.N.; BERSANI-AMADOA, C.A.J. Immunomodulatory effect of *Canova* medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, vol. 51, p. 157-164, 2005.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v.38, p.161-170, 1980.

PICCOLI, C.; RIA, R.; SCRIMA, R.; CELA, O.; D'APRILE, A.; BOFFOLI, D.; FALZETTI, F.; TABILIO, A.; CAPITANIO, N. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n°. 28, p. 26467-76, 2005.

PIEMONTE, M.R. and BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, INF- γ and TNF- α production, $\alpha_5\beta_1$ integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, vol. 3. p 255-263. 2002.

PUNJABI, C.J., LASKIN, D.L., HECK, D.E., LASKIN, J.D. Production of nitric oxide by murine bone marrow cells. Inverse correlation with cellular proliferation. *The Journal of Immunology*, v. 149, n°. 6, p. 2179-84, 1992.

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A. **Williams - Hematology**. 6th edition, McGraw-Hill Medical publishing division. 1939pg. 2001.

RÄISÄNEN, S.R.; ALATALO, S.L.; YLIPAHKALA, H.; HALLEEN, J.M.; CASSADY, A.I.; HUME, D.A.; VÄÄNÄNEN, H.K. Macrophages overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase show altered profile of free radical production and enhanced capacity of bacterial killing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, p. 120-126, 2005.

RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTO, M.; MONTECUCCO, F.; BUSCA, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; PISTOIA, V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. **Stem Cells**, v. 26, p. 151-162, 2008.

ROLINK, A.; TEN BOEKEL, E.; MELCHERS, F.; FEARON, D.T.; KROP, I.; ANDERSSON, J. A Subpopulation of B220⁺ Cells in Murine Bone Marrow Does Not

Express CD19 and Contains Natural Killer Cell Progenitors. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 183, p. 187-194, 1996.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hanemann**, São Paulo, 1999. Tese de doutorado – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

SATO, D.Y.O.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M. GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, vol. 94, p.26-32, 2005.

SAEZ, J.C.; BERTHOUD, V.M.; BRANES, M.C.; MARTINEZ, A.D.; BEYER, E.C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **Physiological Reviews**, v. 83, n° 4, p. 1359-1400, 2003.

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B.Jr. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n°. 16, p. 9631–9635, 1983.

SCHÖNLAU, F.; SCHLESIGER, C.; EHREHEN, J.; GRABBE, S.; SORG, C.; SUNDERKÖTTER, C. Monocyte and macrophage functions in M-CSF-deficient *op/op* mice during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 564-573, 2003.

SELIGMANN, I.C.; LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BUCHI, D.F.; CABRAL, I.R.; BURBANO, R. The anticancer homeopathic composite “*Canova Method*” is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genetics and Molecular Research**, vol. 2 (2), p. 223-228, 2003.

SHARMA, R.; SHARMA, A.; CHAUDHARY, P.; PEARCE, V.; VATSYAYAN, R.; SINGH, S.V.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y.C. Role of lipid peroxidation in cellular responses to D,L-sulforaphane, a promising cancer chemopreventive agent. **Biochemistry**, v. 49, p. 3191-3202, 2010.

SNIPES, R.G.; LAM, K-W.; DODD, R.C.; GRAY, T.K.; COHEN, M.S. Acid phosphatase activity in mononuclear phagocytes and the U937 cell line: monocyte-derived macrophages express tartrate-resistant acid phosphatase. **Blood**, v. 67, n°. 3, p. 729-734, 1986.

SONI, S.; BALA, S.; KUMAR, A.; HANSPAL, M. Changing pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 38, p. 25-31, 2007.

STAQUICINI, F.I.; TANDLE, A.; LIBUTTI, S.K.; SUN, J.; ZIGLER, M.; BAR-ELI, M.; ALIPERTI, F.; PÉREZ, E.C.; GERSHENWALD, J.E.; MARIANO, M.; PASQUALINI, R.; WADIH ARAP, LOPES, J.D. A Subset of Host B Lymphocytes Controls Melanoma Metastasis through a Melanoma Cell Adhesion Molecule/MUC18-Dependent Interaction: Evidence from Mice and Humans. **Cancer Research**, v. 68, n° 20, p. 8419-8428, 2008.

STEM CELL INFORMATION - The National Institutes of Health resource for stem cell research. June 2001. Disponível em: (www.stemcells.nih.gov/index.asp). Acesso: 10/06/2010.

STROPARO, E. **Pacientes HIV/AIDS⁺ tratados com o medicamento homeopático Canova: estudo prospectivo observacional em índices laboratoriais, clínicos e de qualidade de vida.** 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUTER, A.; EVERTS, V.; BOYDE, A.; JONES, S.J.; LÜLLMANN-RAUCH, R.; HARTMANN, D.; HAYMAN, A.R.; COX, T.M.; EVANS, M.J.; MEISTER, T.; VON FIGURA, K.; SAFTIG, P. Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. **Development**, v. 128, p. 4899-4910, 2001.

TAKAHACHI, G.; MALUF, M.L.F.; SVIDZINSKI, T.I.E.; DALALIO, M.M.O.; BERSANI-AMADO, C.A. CUMAN, R.K.N. *In vivo* and *in vitro* effects of the Canova medicine on experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n°. 5, p. 350-354, 2007.

TOCCI, A.; FORTE, L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. **The Hematology Journal**, v. 4, p. 92–96, 2003.

TRAVLOS, G.S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 548–565, 2006.

TSAI, S.; SIEFF, C.A.; NATHAN, D.G. Stromal Cell-Associated Erythropoiesis. **Blood**, v. 67, n° 5, p. 1418-1426, 1986.

TUDOR, K-S.R.S.; PAYNE, K.J.; YAMASHITA, Y.; KINCADE, P.W. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B Lineage differentiation events. **Immunity**, v. 12, p. 335–345, 2000.

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n°. 11, p. 1771-1780, 2005.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p.825-852, 2002.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, n°. 5, p. 639–648, 2004.

WAGEY, R. Mesenchymal cells. www.stemcell.com, 29018 | versão 2.0.0, 2008.

WANG, H-C.; DRAGOO, J.; ZHOU, Q.; JOHN R. KLEIN, J.R. An intrinsic thyrotropin-mediated pathway of TNF α production by bone marrow cells. **Blood**, v. 101, n°. 1, p. 119-123, 2003.

WHETTON, A. D. & GRAHAM, G. J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends in Cell Biology**, vol. 9. p. 233-238. 1999.

WINK, D.A.; COOK, J.A.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M.C.; MITCHELL, J.B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 221-226, 1995.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 94, p. 6954-6958, 1997.

YANG, Y.; SHARMA, R.; SHARMA, A.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y.C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n° 2, p. 319-336, 2003.

YOKOYAMA, T.; ETOH, T.; KITAGAWA, H.; TSUKAHARA, S.; KANNAN, Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erithroid maturation proceeds in the rat bone marrow. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, p. 449-452, 2003.

ZHAN, X and DESIDERIO, D.M. Linear ion-trap mass spectrometric characterization of human pituitary nitrotyrosine-containing proteins. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 259, p. 96–104, 2007.

ZHANG, Y.; HARADA, A.; BLUETHMANN, H.; WANG, J-B.; NAKAO, S.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Tumor Necrosis Factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF α in vitro. **Blood**, v. 86, p. 2930-2937, 1995.

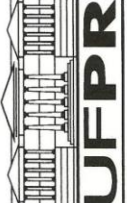

ZHANG, D., JOHNSON, M.M., MILLER, C.P., PIRCHER, T.J., GEIGER, J.N., WOJCHOWSKI, D.M. An optimized system for studies of EPO-dependent murine pro-erythroblast development. **Experimental Hematology**, v. 29. p. 1278-1288, 2001.

ZHANG, P.; QUINTON, L.J.; GAMBLE, L.; BAGBY, G.J.; SUMMER, W.R.; NELSON, S. The granulopoietic cytokine response and enhancement of granulopoiesis in mice during endotoxemia. **Shock**, v. 23, p. 344-352, 2005.

ZHU, J.; EMERSON, S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**, v. 21, p. 3295-3313, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO N.º 209

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIAN.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.
RO 02/2007 – 06/03/2007


PROCESSO: 23075.062122/2006-15

TÍTULO: Ação do medicamento homeopático Canova sobre células de medula óssea de camundongos

AUTORES: Ana Paula Ressetti Abud, Dorly de Freitas Buchi, Beatriz Cezar, Simone Martins de Oliveira, Carolina Camargo de Oliveira, Fernando de Souza Fonseca Guimarães

DEPARTAMENTO: Biologia Celular

Curitiba, 07 de março de 2007.


Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

ANEXO 2

SIGMA DIAGNOSTICS ACID PHOSPHATASE KIT

- Cultivar as células da medula óssea durante 96 horas;
- Após esse período as células sobrenadantes (2×10^4) foram citocentrifugadas (CITOPRO™) durante 5 minutos a 1.500 rpm;
- As células aderentes (lamínulas) e sobrenadantes (citocentrifugado) foram fixadas com solução diluída de citrato: 1ml de citrato concentrado (n°386-1), 9ml de água destilada e 15 ml de acetona;
- Enxaguar em água destilada e deixar secar;
- Preparar o meio de incubação segundo ordem e quantidades descritas no quadro abaixo:

	AcPase total	TRAP	Controle
Água destilada 37°C	3,4ml	3,7ml	3,2ml
Solução de acetato (n°386-3)	0,3ml	0,3ml	0,3ml
Ácido Naftol AS-BI fosfórico (n°386-4)	0,3ml	0,3ml	_____
Solução de tartarato (n°386-2)	_____	0,3ml	_____
Fluoreto 100mM	_____	_____	0,8ml
1 cápsula de Fast Garnet GBC Salt (n°386-15) em 12 ml dH ₂ O	4ml	4ml	4ml
Volume final	8,3ml	8,3ml	8,3ml

- Filtrar e aquecer os meios de incubação em banho-maria à 37°C, antes de colocá-los nas células;
- Incubar durante 1 hora, à 37°C, no escuro;
- Lavar em água destilada por 3 minutos;
- Corar com solução de hematoxilina (n°285-2) por 5 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos e montar a lâmina com glicerol.

OBS: Além dos grupos de tratamento, neste experimento foi realizado um grupo controle da reação enzimática. Neste grupo não foi adicionado o substrato da enzima, no entanto adicionou-se Fluoreto de Sódio (inibidor da AcPase) para que se pudesse garantir a especificidade da marcação.

ANEXO 3

DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO (O_2^-)

segundo SASADA; PABST; JOHNSTON, 1983

- Cultivar as células em placas de 96 poços (5×10^5 células/ml por poço) pelos tempos determinados;
- Centrifugação das placas (2000 rpm por 5 minutos) e retirada do sobrenadante celular (a placa precisa ser centrifugada para que não haja perda das células sobrenadantes);
- Adicionar meio de reação contendo citocromo c $80 \mu\text{M}$ dissolvido em *Hank's Buffer Salt Solution* (HBSS) (com ou sem complexos testados), OBS: P.M. citocromo c = 12327;
- Como controle positivo adicionar ao meio de reação PMA na concentração de $1 \mu\text{l/ml}$. Para isso as placas foram divididas em duas partes iguais sendo que a metade foi utilizada como controle positivo, dessa maneira cada grupo de tratamento foi analisado com e sem a presença de PMA; OBS: utilizar um poço como branco, contendo o meio de reação sem as células e sem PMA;
- Após os tempos determinados (15 e 30 minutos de incubação a 37°C), retirar o sobrenadante e passar para uma placa nova de 96 poços;
- Ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm;
- Na leitura, os poços devem ser zerados com o branco = HBSS + citocromo c.

Cálculo:

Para determinar a concentração de O_2^- correspondente à concentração de citocromo c reduzido usa-se o Coeficiente de Extinção Molar ($\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

$$C = A/\epsilon$$

ANEXO 4

DETECÇÃO DA LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

Método baseado na oxidação, dependente de peroxidase, do vermelho de fenol pelo H₂O₂, segundo PICK; MIZEL, 1981

- Cultivar as células em placas de 96 poços (5 x 10⁵ células/ml por poço) pelos tempos determinados,
- Centrifugação das placas (2000 rpm por 5 minutos) e retirada do sobrenadante celular (a placa precisa ser centrifugada para que não haja perda das células sobrenadantes);
- Adição de 200µl de meio de incubação contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – SIGMA®) dissolvidos em *Hank's Buffer Salt Solution* (HBSS) em todos os poços;
- Como controle positivo adicionar ao meio de incubação *phorbol myristate acetate* (PMA) na concentração de 1µl/ml. As placas foram divididas em duas partes iguais sendo que a metade foi utilizada como controle positivo, dessa maneira cada grupo de tratamento foi analisado com e sem a presença de PMA;
- Após os tempos determinados (15 e 30 minutos de incubação a 37°C), retirar o sobrenadante e passar para uma placa nova de 96 poços contendo 10µl de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço correspondente. O NaOH é utilizado para interromper a reação;
- Quantificação da oxidação do vermelho de fenol através de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados serão obtidos em densidade óptica e deverão ser comparados com uma curva padrão de concentrações variáveis de H₂O₂.

Curva:

- Diluir o H₂O₂ a 1:10, 1:100 e 1:1000 em água destilada e obter a concentração dessas soluções através de sua absorbância em 240 nm (em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo e lâmpada de deutério);
- Utilizar a absorbância encontrada na solução 1:1000 na fórmula $C = A/\epsilon$ (Onde A = absorbância, $\epsilon = 39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e C = concentração);
- Preparar uma solução mãe (concentração de 1 mmolar) a partir da solução de H₂O₂ 1:100 em vermelho de fenol 1M diluído em HBSS;
- Preparar soluções nas concentrações de 1, 10, 25 e 50 nmoles e colocá-las em banho-maria à 37°C;

- Adicionar peroxidase na concentração final de 15U/ml e após 15 minutos adicionar 10 μ l de NaOH a 1M;
- Ler em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm utilizando como branco apenas a solução mãe.

OBS: O PMA é utilizado como controle positivo, uma vez que é conhecido como potencializador da produção de H_2O_2 pelos macrófagos.

ANEXO 5

DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

segundo GREEN *et al.*, 1982

- Cultivar as células em placas de 96 poços (5×10^5 células/ml por poço) pelos tempos determinados,
- 24 horas antes do término de cada tempo de incubação centrifugar as placas (2000 rpm por 5 minutos) e retirar o sobrenadante celular (a placa precisa ser centrifugada para que não haja perda das células sobrenadantes), dividir as placas em duas partes iguais sendo que à metade foi adicionado meio de cultura DMEM acrescido de LPS (50ng/ml) e IFN γ (26U/ml) (controle positivo) e na outra metade apenas DMEM. Dessa maneira cada grupo de tratamento foi analisado com e sem a presença de LPS e IFN γ ;
- Após o tempo de incubação realizar nova centrifugação das placas (2000 rpm por 5 minutos) e retirada do sobrenadante celular;
- Retirar 100 μ l do sobrenadante e transferir para uma placa nova;
- Adicionar 100 μ l do reagente de Griess (1:1 de Solução A: naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%), OBS: As soluções separadas podem ser estocadas na geladeira por 1 mês, misturar apenas no momento da utilização;
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente;
- Ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm, OBS: utilizar um poço como branco, contendo apenas o reagente de Griess;
- Calcular a concentração de NO, utilizando curva padrão de nitrito de sódio (10 – 160 μ M).

ANEXO 6

VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE NITROPROTEÍNAS

- Cultivar as células em garrafas de cultura de 25 cm² (8 x 10⁷ células/ml por garrafa)
- Adicionar meio de incubação às células;
- Após 24 horas de incubação foi realizada a separação das células sobrenadantes e aderentes. O sobrenadante celular foi centrifugado (2000 rpm por 5 minutos). A população celular sobrenadante foi mantida em tubos Falcon[®] e as células aderentes permaneceram nas garrafas);
- As duas populações celulares foram lavadas com PBS;
- Adição do tampão de lise mais inibidores de proteases* (coquetel da Roche) (100µl de solução) às duas populações celulares;
- Incubação por 10 - 15 minutos a 4°C (movimentar as garrafas e tubos algumas vezes durante esse período);
- Após a incubação raspar as células aderentes das garrafas com *scrap*, coletar o material e transferir para tubos Eppendorfs[®];
- Centrifugar os tubos Falcon[®] e Eppendorfs[®] a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e armazenar o sobrenadante a - 20°C;
- Fazer dosagem de proteínas das amostras pelo método de BRADFORD *et al.*, 1976;
- Plotagem das amostras em membrana de nitrocelulose (Amersham-Biosciences[®]) (40µg de proteína);
- Bloqueio da membrana (2 horas à temperatura ambiente) com tampão de bloqueio TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris-base e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé[®]);
- Incubação com o anticorpo primário *anti-nitrotyrosine* (*antibody produced in rabbit*) (SIGMA[®]), diluído na proporção de 1:1000 em tampão de bloqueio à 4°C por 16 horas sob agitação;
- Lavar a membrana (5x de 3 minutos) com TBST a temperatura ambiente;
- Incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com peroxidase (SIGMA[®]) diluído na proporção de 1:500 em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente;
- Lavar a membrana (5x de 3 minutos) com TBST a temperatura ambiente;

- Revelação da membrana com substrato quimioluminescente (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate # 34077 - Pierce[®]*) e exposição dessa ao filme radiográfico (Kodak[®]) até obtenção de sinal adequado.

* Tampão de lise:

Nonidet P40 (NP40) – SIGMA[®]

Usa-se 1% de NP40 em PBS

Solução final:

500μ do tampão de lise 1% + 50μ do coquetel da Roche[®] (inibidores de proteases)

ANEXO 7

IMUNOCITOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS - *MOUSE*
TH1/TH2 CYTOKINE CBA (BD/PHARMINGEN)

- Sobrenadante celular retirado e centrifugado, para que as células presentes fossem discriminadas;
- Separação da alíquota (50µl) de cada amostra de sobrenadante;
- Adição de 2,5µl de cada anticorpo conjugado com partícula fluorescente (*mouse cytokine capture bead*) aos tubos testes (12,5µl no total) (as soluções dos anticorpos devem ser vortexadas antes da utilização). Os *beads* conjugados a cada anticorpo apresentam fluorescências diferentes;
- Adição das alíquotas de sobrenadante aos tubos;
- Adição do *mouse Th1/Th2 PE detection reagent* (anticorpos, específicos para cada citocina, acoplados ao fluorocromo ficoeritrina -PE);
- Incubação por 3 horas, a temperatura ambiente, no escuro;
- Adição, a cada tubo, de 100µl de *wash buffer* (solução de lavagem e leitura);
- Centrifugação a 1.300 rpm por 5 minutos;
- Sobrenadante descartado e nova adição de 200µl de *wash buffer*;
- Solução homogeneizada e vortexada;
- Análise no citômetro de fluxo FACSCalibur.

ANEXO 8

IMUNOCITOQUÍMICA PARA IMUNOFENOTIPAGEMProtocolo para as células sobrenadantes após tratamento *in vitro*

- Centrifugação do sobrenadante da cultura a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Sobrenadante desprezado e fixação do *pellet* celular com 1 ml de paraformaldeído (EMS) 1%, por 1 hora;
- Centrifugação das células fixadas a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Sobrenadante desprezado;
- Lavagem com PBS através de centrifugação a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Concentração celular ajustada para 10^6 . As alíquotas foram adicionadas a tubos tipo Eppendorfs® separados;
- Adição de 99µl de PBS e 1µl de cada anticorpo primário (concentração final do anticorpo 0,5µg%). Todos os anticorpos utilizados são biotinizados;
- Incubação por 40 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugação dos tubos a 2.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado;
- Adição de 99µl de PBS e 1µl de estreptavidina conjugado com o fluorocromo ficoeritrina, em cada tubo (concentração final da estreptavidina 0,5µg%);
- Incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente, no escuro;
- Centrifugação dos tubos e sobrenadante desprezado;
- Lavagem das células com 100µl de PBS;
- Centrifugação das células e sobrenadante descartado;
- Adição, aos tubos, de 800µl de PBS para a leitura no citômetro de fluxo;
- Foram utilizados mais dois tubos, um contendo apenas células (controle da autofluorescência celular) e outro apresentando células marcadas apenas com a estreptavidina (controle da fluorescência), ambos para calibrar os parâmetros do aparelho;
- Aquisição e análise no citômetro de fluxo FACSCalibur®.

Protocolo para a população total após tratamento *in vivo*

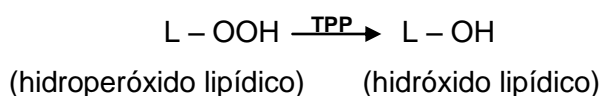
- Imediatamente após a coleta - centrifugação, fixação e processamento das células, da mesma maneira que as mantidas em cultura.

ANEXO 9

ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA REALIZADA PELAS CÉLULAS MEDULARESsegundo NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994

- Separação de 10^7 células de cada grupo de tratamento;
- Homogeneização das alíquotas celulares em metanol e centrifugação a 5000G por 5 minutos a 4°C;
- Foram retiradas alíquotas de 90 µl do sobrenadante de cada amostra, as quais foram adicionadas a tubos Eppendorfs®. Foram realizados 3 grupos de análise, todos em triplicata;
- O grupo 1 recebeu 10 µl de solução metanólica de TPP (trifenilfosfina - SIGMA®) 10 mM (para haver a redução seletiva de hidroperóxidos lipídicos), o grupo 2 recebeu apenas 10 µl de metanol e o grupo 3 foi submetido a análise de quantificação protéica pelo método de BRADFORD *et al.*, 1976;
- Agitação dos grupos 1 e 2 e incubação à temperatura ambiente por 30 minutos;
- Adição a cada tubo de 900 µl do reagente FOX2 (xilenol laranja 100 µM - SIGMA®, hidroxitolueno butilado 400 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250µM em metanol 90%);
- Agitação e incubação à temperatura ambiente por 30 minutos;
Nesta etapa, os íons ferrosos (Fe^{2+}) do reativo de FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos lipídicos quanto por outros tipos de hidroperóxidos presentes na amostra). Como todos os hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TPP foram reduzidos, a produção de Fe^{3+} será menor nessas do que nas amostras não tratadas com TPP. O Fe^{3+} formado é então quelado pelo xilenol laranja, o que faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-purpura (passa a absorver luz em 560nm).
- Leitura em espectrofotômetro utilizando filtro de comprimento de onda de 560nm.

OBS: Os grupamentos hidroperóxidos, especificamente os presentes em lipídios, são convertidos a grupamentos hidroxilas pela trifenilfosfina.



ANEXO 10

IMUNOCITOQUÍMICA PARA ANÁLISE DE CONEXINA 43 - CÉLULAS
SOBRENADANTES E ADERENTES

- Retirar o meio de cultura das células sobrenadantes por centrifugação a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Lavar as células aderentes e sobrenadantes com PBS;
- Fixação do *pellet* celular e das células aderentes com paraformaldeído (EMS) 1%, por 1 hora;
- Raspar as células aderentes das garrafas com *scrap*, coletar o material e transferir para tubos Falcon®;
- Centrifugação das células sobrenadantes e aderentes fixadas a 2.800 rpm por 3 minutos, para desprezar o fixador;
- Lavagem com PBS através de centrifugação a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Concentração celular ajustada para 10^6 . As alíquotas foram adicionadas a tubos tipo Eppendorfs® separados;
- Adição de 99µl de PBS e 1µl de anticorpo contra conexina 43 (concentração final do anticorpo - 0,5µg%);
- Incubação por 40 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugação dos tubos a 2.500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante desprezado;
- Adição de 99µl de PBS e 1µl de anticorpo secundário *anti mouse* IgG conjugado com fluoresceína (FITC) (concentração final - 0,5µg%);
- Incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente, no escuro;
- Centrifugação dos tubos e sobrenadante desprezado;
- Lavagem das células com 100µl de PBS. Nova centrifugação e sobrenadante descartado;
- Adição, aos tubos, de 800µl de PBS para a leitura no citômetro de fluxo;
- Foram utilizados mais dois tubos, um contendo apenas células e outro apresentando células marcadas apenas com a fluoresceína, ambos para calibrar os parâmetros do aparelho;
- Aquisição e análise no citômetro de fluxo FACSCalibur®.

ANEXO 11

IMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL - CÉLULAS ADERENTES

- Até a fixação das células, a placa foi mantida sobre o gelo;
- Retirar o meio de cultura dos poços e lavar as células 10 vezes, com PBS (o PBS foi colocado e, ao mesmo tempo, retirado dos poços com o auxílio de duas pipetas de 10 ml);
- Bloqueio dos sítios inespecíficos das células com uma solução de PBS/BSA (albumina) – *Electron Microscopy Sciences* (EMS) 1% por 20 minutos;
- Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- Incubação com o anticorpo primário anti-CD11b biotinilado (BD/Pharmingen) diluído em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos. A concentração final do anticorpo foi de 1µg%;
- Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- Fixar as células. Para este procedimento, as lamínulas foram transferidas para uma placa de cultivo nova, para se evitar a presença de restos celulares. Antes da transferência das lamínulas deve se colocar 500µl de PBS em cada poço para evitar a secagem do material;
- O PBS foi retirado e adicionado paraformaldeído (PFA) 2% em PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente;
- Lavar novamente as células com PBS, da maneira já citada;
- Bloquear os radicais aldeídos do PFA (para evitar a auto-fluorescência do fixador), com glicina 0,1M em PBS (300µl por poço), por 2 minutos;
- Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, desde que as células sejam mantidas a 4°C e os poços estejam bem preenchidos com PBS;
- Novo bloqueio dos sítios inespecíficos das células com a solução de PBS/BSA 1% por 20 minutos;
- Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- Incubação com o anticorpo anti porção Fc (*Fc block* – BD-Pharmingen), para evitar marcação inespecífica, diluído em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos, na concentração final de 1µg%;
- Como segundo passo usou-se estreptavidina conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (PE), diluída em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos no escuro, na concentração final de 1µg%. Não é preciso efetuar nova lavagem antes deste

procedimento (antes da incubação, a solução de estreptavidina foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, para evitar precipitados);

- Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- Retirar as lamínulas da placa de cultivo, mergulhar rapidamente em água destilada e efetuar a montagem;
- Montagem das lâminas com resina Vectashield® contendo o corante nuclear DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride) (Vector®) na concentração de 1,5 µg/ml;
- Manutenção das lamínulas a 4°C para secagem. Após a secagem, as lamínulas foram vedadas com esmalte e mantidas no escuro, a 4°C, até a visualização do material ao microscópio confocal.

OBS: As células não podem secar em nenhum momento do experimento.

ANEXO 12

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

- Retirada das membranas das placas *transwell* (Costar®) modelo número 3413 apresentando tamanho de poro de 0,4µm. Nestas membranas se localizavam os macrófagos peritoneais utilizados para a co-cultura os quais serão analisados através de microscopia eletrônica de varredura;
- Fixação das células com glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,2 por, no mínimo, 1 hora. O experimento pode ser interrompido neste passo;
- Lavar as células com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, 2 vezes, 10 minutos cada;
- Fixação com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, por 30 minutos, no escuro;
- Lavar as células com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, 2 vezes, 10 minutos cada;
- Desidratação do material:
 - álcool* 50% - 10 minutos;
 - álcool 50% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos (aqui se pode parar o procedimento);
 - álcool 90% - 10 minutos;
 - álcool 90% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos.
- Ponto crítico e metalização do material foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

OBS*: A desidratação foi realizada com álcoois obtidos a partir de álcool Merck® absoluto

ANEXO 13

ANNEXIN V: FITC APOPTOSIS DETECTION KIT

- Cultivar as células por 48 horas;
- Retirar as células da placa e centrifugar (2.000 rpm por 3 minutos) para retirar o sobrenadante;
- Lavar com PBS (nova centrifugação);
- Adição de 100µl do tampão que promove a ligação do anticorpo anti-anexina (*annexin V binding buffer*);
- Adição de 2µl do anticorpo anti-anexina conjugado com FITC;
- Incubação por 15 minutos;
- Adição de 5µl de Iodeto de Propídio (PI) e 200µl de tampão;
- Aquisição e análise pelo citômetro de fluxo FACSCalibur.

OBS 1: Durante o processo apoptótico as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar seu suicídio ao ambiente. A exposição da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorrem e a anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos. Na presença de íons cálcio essa proteína exibe alta afinidade pela fosfatidilserina, mas apresenta baixa afinidade por outras espécies de fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, esfingomiélin e fosfatidilcolina.

OBS 2: A fluoresceína foi detectada pelo canal FL1 e o Iodeto de Propídio pelo canal FL3.

ANEXO 14

VERIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

segundo DUA; GUDE, 2006

- Cultivar as células por 48 horas;
- Retirar as células da placa e centrifugar (2.000 rpm por 3 minutos) para retirar o sobrenadante;
- Lavar com PBS (nova centrifugação);
- Adição de 1000µl de álcool 70% (Merck®);
- Manter a -20°C por, no mínimo, 16 horas;
- Centrifugar (2.000 rpm por 3 minutos) para retirar o álcool 70%;
- Lavar com PBS (nova centrifugação);
- Adicionar a solução de iodeto de propídeo na concentração de 20 µg/ml e incubar por 1 hora a temperatura ambiente, no escuro;
- Lavar com 900 µl de PBS (nova centrifugação);
- Descartar o sobrenadante e ressuspender em 300 µl de tampão;
- Aquisição e análise pelo citômetro de fluxo FACSCalibur.

OBS: O Iodeto de Propídeo foi detectado pelo canal FL3.